

Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas



**UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA**

TESIS DOCTORAL

**Evaluación de la relevancia de los sistemas de
dos componentes en la tolerancia a estrés de
*Sinorhizobium (Ensifer) meliloti***

Lic. Francisco Javier Albicoro

Directora: Dra. M. Florencia Del Papa

Co-Director: Prof. Dr. Antonio Lagares

2018



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

**Evaluación de la relevancia de los sistemas de
dos componentes en la tolerancia a estrés de
*Sinorhizobium (Ensifer) meliloti***

Lic. Francisco Javier Albicoro

Directora: Dra. María Florencia Del Papa

Codirector: Dr. Antonio Lagares

Año 2018

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas ha sido realizado en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM) de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata – CCT – La Plata –CONICET, bajo la dirección de la Dra. María Florencia Del Papa y la codirección del Dr. Antonio Lagares.

La Plata, marzo de 2018.

A mis viejos.-

Mi reconocimiento

A la Educación pública y gratuita.

A la Universidad Nacional de La Plata, por todos estos años de formación.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD) por las becas otorgadas.

Al Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM), por brindarme el lugar físico para llevar a cabo la realización de este trabajo.

A las cátedras Introducción a la Química y Química de Correlación, por posibilitar desempeñarme como docente.

Mi agradecimiento

A la Dra. María Florencia Del Papa, por darme la oportunidad de comenzar una carrera científica. Gracias Flor por brindar todo necesario para que este trabajo se concrete. Gracias por la paciencia y estímulo; y por ayudarme, día tras día, a mejorar.

Al Prof. Dr. Antonio Lagares, por la codirección de esta Tesis. Gracias por estar siempre dispuesto a solventar mis inquietudes, y por contagiar entusiasmo.

Al Prof. Karsten Niehaus, por darme la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio.

A los compañeros del laboratorio. A Piru, Charly, José, Yuli, Moni, Ile, Lucas y Ezequiel. Gracias por la buena onda de todos los días. Gracias por siempre darme una mano y por quererme así, plantao. Gracias Piru y Charly por ayudarme un montón en los primeros días en el Instituto. Gracias José por los chistes en n -dimensiones.

A los más experimentados del grupo: Walter, Mariano, Mauri y Gonza. Porque siempre estar dispuestos a ayudar. Gracias Gonza por ayuda en Bielefeld!

A Walter. Por la enorme contribución en este trabajo.

Gracias Claudio y Ulises por los ensayos de plantas y los análisis bioinformáticos.

A laboratorio R3. Si bien no está claro quién es el huésped, gracias por la simbiosis de todos los días. Gracias Florcita por los buenos momentos compartidos.

Al personal de apoyo y administrativos del Instituto, en especial a Paula, Silvana y Juliana. Gracias por la ayuda de todos los días.

A los becarios del IBBM, por el compañerismo.

A Piru, por la edición del manuscrito; y a Leti, por el arte de tapa. Muchísimas gracias!

Muy especialmente,

A los amigos de la facultad y de siempre, por todos los momentos divertidos que compartimos.

A mi hermosa familia. Especialmente a mis viejos y Santi, por el profundo y tierno afecto que me dan todos los días.

A Emi. Porque haces hermosos mis días y mis noches. Gracias por el permanente sostén en estos años.

Abreviaturas utilizadas en este trabajo

ADN:	Ácido desoxirribonucleico.
ANOVA:	Análisis de varianza.
asRNA	ARN antisentido (del inglés, <i>anti-sense RNA</i>).
ARNm	ARN mensajero.
bp:	Pares de bases.
cm:	Centímetro.
°C:	Grado Celsius.
dpi	Días pos inoculación.
DNAsa:	Desoxirribonucleasa.
DO ₆₀₀ :	Densidad Óptica a 600 nm.
EPS:	Exopolisacárido.
FBN:	Fijación Biológica de Nitrógeno.
FN:	Nod <i>factors</i> .
g:	gramo.
GS:	Medio Mínimo de crecimiento bacteriano.
hs:	Horas.
Kb:	Kilobase.
l:	Litro.
LPS:	Lipopolisacárido.
m:	Metro.
M:	Molar.
mg:	Miligramo.
min.:	Minuto.
ml:	Mililitro.
mm:	Milímetro.
mM:	Milimolar.
n:	Número de casos.
ng:	Nanogramo.
nm:	Nanometro.
nM:	Nanomolar.
pb:	Pares de bases nucleotídicas.
PCR:	" <i>Polymerase Chain Reaction</i> ", reacción en cadena de la polimerasa.
pH:	Potencial Hidrógeno.
RNAsa:	Ribonucleasa.
rpm:	Revoluciones por minuto.
Tn5:	Transposón Tn5.
UFC:	unidades formadoras de colonias bacterianas.
xg:	Unidades "g" de centrifugación.
μ(h ⁻¹)	Velocidad máxima de crecimiento de cultivo <i>batch</i> .
μg:	Microgramo.
μM:	Micromolar.
μl:	Microlitro.
α:	Letra griega alfa.
β:	Letra griega beta.
γ:	Letra griega gamma.
σ:	Letra griega sigma.
ρ:	Letra griega rho.
Δ:	Letra griega delta. Utilizada para indicar mutaciones delecionales.
%:	Porcentaje.

Indice

Indice de figuras	- 19 -
Indice de tablas	- 21 -
1.Introducción	- 23 -
1.1. Producción primaria de alimentos en el marco de una agricultura sustentable	- 25 -
1.2. La Fijación Biológica de Nitrógeno	- 26 -
1.2.1. Contribución de la FBN en el ciclo del nitrógeno y en la fertilidad de los suelos	- 27 -
1.3. Los rizobios	- 27 -
1.4. Las leguminosas	- 29 -
1.5. La simbiosis rizobio-leguminosa	- 30 -
1.5.1. Etapas tempranas de la interacción simbiótica <i>Ensifer meliloti</i> - <i>Medicago sativa</i>	- 31 -
1.5.2. Formación y progresión del hilo de infección	- 33 -
1.5.3. Supervivencia del rizobio en el simbiosoma y posterior diferenciación	- 35 -
1.5.4. Expresión de la nitrogenasa, reducción del nitrógeno y FBN	- 36 -
1.5.5. Nódulos determinados e indeterminados	- 38 -
1.6. La influencia del ambiente en la simbiosis	- 39 -
1.7. El concepto de estrés bacteriano	- 40 -
1.8. Tolerancia a estrés ácido en bacterias. Mecanismos implicados en el mantenimiento del pH interno	- 41 -
1.8.1. Mecanismos activos involucrados en el mantenimiento del pH intracelular	- 42 -
1.8.2. Mecanismos pasivos que contribuyen al mantenimiento del pH intracelular	- 43 -
1.8.3. Regulación de la expresión génica en la homeostasis del pH intracelular	- 43 -
1.9. Sistemas de dos componentes bacterianos	- 44 -
1.9.1. Transferencia de la información a través de módulos	- 45 -
1.9.2. Histidina quinasas	- 47 -
1.9.2.1. Dominios presentes en los módulos sensores	- 47 -
1.9.2.2. Dominio transmembrana	- 48 -
1.9.2.3. Dominios de transducción de señales intracelulares	- 48 -
1.9.2.4. Dominios presentes en los módulos transmisores	- 48 -
1.9.3. Percepción de la señal por las histidina quinasas	- 49 -
1.9.4. Reguladores de respuesta	- 54 -

1.9.4.1. El dominio REC de los reguladores de respuesta	- 54 -
1.9.5. Modulación de la actividad de los TCS por proteínas accesorias	- 57 -
1.9.5.1. Contribución de las proteínas accesorias a las primeras etapas de la señalización	- 57 -
1.9.5.2. Modulación del estado de fosforilación de HKs y RRs por proteínas accesorias	- 58 -
HIPÓTESIS DE TRABAJO	- 61 -
Objetivos	- 61 -
A- Objetivo general	- 61 -
B- Objetivos específicos	- 61 -
2. Materiales y Métodos	- 63 -
2.1. Procedimientos microbiológicos	- 65 -
2.1.1. Cultivos bacterianos y condiciones de cultivo	- 65 -
2.1.2. Curvas de crecimiento y utilización de antibióticos	- 68 -
2.1.3. Técnica utilizada para el recuento de bacterias viables	- 68 -
2.1.4. Curvas de muerte para evaluar la respuesta de tolerancia a la acidez (ATR)	- 68 -
2.1.5. Ensayos de tolerancia a metales de transición	- 69 -
2.2. Bases de datos y herramientas bioinformáticas utilizadas	- 69 -
2.3. Construcción de mutantes por recombinación homóloga simple	- 71 -
2.3.1. Cepas bacterianas, plásmidos y <i>primers</i> utilizados	- 71 -
2.4. Transferencia de ADN foráneo	- 76 -
2.4.1. Transformación por electroporación	- 76 -
2.4.2. Conjugación	- 76 -
2.5. Construcción de mutantes delecionales	- 77 -
2.6. Restauración de la mutación por complementación	- 78 -
2.7. Construcciones genéticas y manipulación de ADN	- 79 -
2.7.1. Preparaciones de ADN plasmídico	- 79 -
2.7.2. Purificación de bandas de gel de agarosa	- 79 -
2.7.3. Determinación de concentraciones de ADN	- 80 -
2.7.4. Electroforesis en geles de agarosa	- 80 -
2.7.5. Tratamientos enzimáticos del ADN	- 80 -
2.8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y síntesis de ADNc	- 81 -

2.8.1. PCR y oligonucleótidos utilizados	- 81 -
2.8.2. Extracción de ARN	- 81 -
2.8.3. Síntesis de ADN complementario	- 81 -
2.9. Visualización de lipopolisacáridos de membrana	- 81 -
2.9.1. Extracción de lipopolisacáridos de membrana	- 81 -
2.9.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida	- 82 -
2.10. Técnicas utilizadas para los análisis proteómicos	- 83 -
2.10.1. Extracción de proteínas totales	- 83 -
2.10.2. Fraccionamiento subcelular para separar proteínas citosólicas y de membrana	- 83 -
2.10.3. Análisis de proteínas mediante geles de poliacrilamida discontinuos en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	- 83 -
2.10.4. Cuantificación, reducción, alquilación y precipitación de las proteínas	- 84 -
2.10.5. Identificación de proteínas por LC/MS-MS	- 84 -
2.10.6. Análisis de los datos	- 85 -
2.11. Técnicas utilizadas para los análisis metabolómicos	- 85 -
2.11.1. Obtención y tratamiento de las células	- 85 -
2.11.2. Ruptura de las células y derivatización de los metabolitos	- 85 -
2.11.3. Identificación de los metabolitos por GS/MS-MS	- 87 -
2.11.4. Análisis estadístico y cuantificación diferencial de metabolitos	- 88 -
2.12. Ensayos en plantas	- 88 -
2.12.1. Esterilización y germinación de semillas	- 88 -
2.12.2. Condiciones de cultivo de las plantas	- 88 -
2.12.3. Experimentos de competición por la adhesión a raíz de plantas de alfalfa	- 89 -
2.12.4. Experimentos de competición por la colonización de nódulos de plantas de alfalfa	- 90 -
2.12.5 Análisis de la cinética de nodulación de <i>E. meliloti</i> 2011 y sus mutantes	- 90 -
2.12.6. Ensayos de nodulación de plantas de alfalfa	- 90 -
2.12.7. Determinación del peso seco de parte aérea de plantas	- 91 -
2.12.8. Reaislamiento de los rizobios a partir de nódulos de plantas de alfalfa	- 91 -
2.13. Técnicas de microscopía	- 91 -
2.13.1 Microscopía óptica	- 91 -
2.13.2 Microscopía electrónica de transmisión (MET)	- 91 -

2.13.3. Microscopía confocal en la determinación de bacteroides vivos/muertos	- 92 -
2.16. Programas estadísticos utilizados	- 92 -
3. Predicción y clasificación de los sistemas de dos componentes presentes en <i>Ensifer meliloti</i> 2011	- 93 -
3.1. Introducción	- 95 -
3.2. Resultados y discusiones	- 97 -
3.2.1. Histidina quinasas de <i>E. meliloti</i> 2011	- 98 -
3.2.2. Reguladores de Respuesta de <i>E. meliloti</i> 2011	- 99 -
3.3. Conclusiones	- 107 -
4. Rol de los sistemas de dos componentes en la tolerancia a la acidez de <i>Ensifer meliloti</i>: identificación, caracterización funcional en vida libre y predicción de sus vínculos evolutivos	- 111 -
4.1. Introducción	- 113 -
4.2 Resultados y discusión	- 114 -
4.2.1. Generación de una colección de mutantes en genes que codifican para posibles reguladores de respuesta en <i>E. meliloti</i> 2011.	- 114 -
4.2.2. Identificación de mutantes de <i>E. meliloti</i> 2011 que presenten fenotipos diferenciales en la capacidad de la bacteria para crecer en acidez	- 116 -
4.2.3. Comportamiento del mutante RR SMc02366 frente a otros estreses abióticos	- 117 -
4.2.4. SMc02366 forma parte de una unidad transcripcional predicha <i>in silico</i> : Identificación y caracterización de los genes que componen el operón	- 118 -
4.2.5. Análisis de la relevancia de los genes que componen el operón en la tolerancia a acidez	- 121 -
4.2.6. Rol del regulador SMc02366 en la respuesta de tolerancia a la acidez	- 124 -
4.2.7. Análisis <i>in silico</i> del TCS SMc02366/SMc02367	- 125 -
5. Utilización de herramientas proteómicas para la búsqueda y caracterización de marcadores moleculares afectados por SMc02366 en <i>Ensifer meliloti</i> cultivado a pH ácido	- 137 -
5.1. Introducción	- 139 -
5.2.1. Análisis del perfil de expresión diferencial de proteínas obtenidas de cultivos de Eme Δ RR y Eme wt en condiciones ácidas	- 141 -
5.2.2. Proteínas de Clase I reprimidas en el mutante <i>E. meliloti</i> Δ RR	- 145 -
5.2.3. Proteínas de Clase I sobre-expresadas en el mutante <i>E. meliloti</i> Δ RR	- 149 -

5.2.4. Proteínas diferenciales de Clase II	- 153 -
5.3. Conclusiones	- 159 -
6. Búsqueda e identificación de metabolitos intracelulares afectados por SMc02366 en <i>E. meliloti</i> cultivado a pH ácido y neutro. Un enfoque metabolómico	- 165 -
6.1. Introducción	- 167 -
6.2. Resultados y discusión	- 169 -
6.2.1. Diseño experimental e identificación de metabolitos intracelulares por GC/MS-MS	- 169 -
6.2.2. Análisis estadísticos multivariados	- 171 -
6.2.3. Análisis estadísticos univariados	- 175 -
6.2.4 Vías metabólicas del carbono, de las pentosas fosfato y ciclo de los ácidos tricarboxílicos	- 178 -
6.2.4. Modificaciones en las proporciones de aminoácidos encontrados en el citosol de células de Eme Δ RR cultivadas en medio ácido	- 181 -
6.3. Conclusiones	- 186 -
7. Impacto de la mutación de SMc02366 y SMc02367 sobre la simbiosis entre <i>E. meliloti</i> 2011 y <i>Medicago sativa</i>	- 189 -
7.1. Introducción	- 191 -
7.2. Resultados y Discusión	- 192 -
7.2.1. Determinación del impacto de la mutación en SMc02366 y SMc02367 sobre etapas tempranas de la interacción <i>E. meliloti</i> - <i>M. sativa</i>	- 192 -
7.2.2. Caracterización de la simbiosis de los mutantes en SMc02366 y SMc02367 de <i>E. meliloti</i> 2011 con <i>Medicago sativa</i>	- 194 -
7.2.3. Determinación del impacto de la mutación en SMc02366 y SMc02367 sobre etapas tardías de la interacción <i>E. meliloti</i> - <i>M. sativa</i>	- 195 -
7.2.3.1. Análisis morfológico de nódulos de <i>Medicago sativa</i> inducidos por <i>E. meliloti</i> 2011 salvaje y cepas mutantes	- 196 -
7.2.3.2. Examinación microscópica a mayor aumento de células simbióticas presentes en la zona III de nódulos de <i>Medicago sativa</i> inducidos por <i>E. meliloti</i> 2011 salvaje y cepas mutantes	- 197 -
7.2.3.3. Análisis de la ultraestructura de nódulos de <i>Medicago sativa</i> inducidos por <i>E. meliloti</i> 2011 salvaje y cepas mutantes isogénicas mediante TEM	- 199 -
7.2.3.4. Estudios de viabilidad de bacteroides de <i>E. meliloti</i> 2011 salvaje y cepas mutantes mediante microscopía confocal	- 202 -

7.3. Conclusiones	- 205 -
Discusión general	- 207 -
Bibliografía	- 215 -

Indice de figuras

Figura 1. 1. Etapas tempranas de la interacción rizobio-leguminosa	- 33 -
Figura 1. 2. Desarrollo y progresión del hilo de infección.	- 34 -
Figura 1. 3. Estructura de nódulos determinados e indeterminados.	- 39 -
Figura 1. 4. Esquema del modo de acción de una HK y un RR en un TCS típico.	- 46 -
Figura 1. 5. Esquema ilustrativo de la organización de los módulos en una Histidina quinasa Híbrida (HQh).	- 46 -
Figura 1. 6. Histidina quinasa típica.	- 49 -
Figura 1. 7. Diagrama de cintas del dominio REC del RR CheY de <i>E. coli</i> .	- 55 -
Figura 2. 1. Esquema ilustrativo de la técnica de crossover PCR.	- 78 -
Figura 2. 2. Derivatización con metoxilamina y MSTFA.	- 86 -
Figura 3. 1. Clasificación de los RRs presentes en el genoma de <i>E. meliloti</i> 2011.	- 101 -
Figura 4.1. Análisis de la velocidad máxima de crecimiento del mutante en el RR SMc02366 en medio ácido.	- 117 -
Figura 4.2. Análisis de la velocidad máxima de crecimiento del mutante RR SMc02366 en condiciones de estrés salino y estrés por alta temperatura.	- 118 -
Figura 4.3. Contexto génico del RR SMc02366.	- 120 -
Figura 4.4. Validación experimental de la estructura del operón que contiene al RR SMc02366.	- 121 -
Figura 4.5. Ensayo de complementación funcional de los mutantes EmeΔRR y EmeΔHK.	- 123 -
Figura 4.6. Análisis de la velocidad máxima de crecimiento de las cepas mutantes en medio ácido.	- 123 -
Figura 4.7. Evaluación de la respuesta adaptativa de tolerancia a la acidez en cultivos de Eme wt y Eme ΔRR.	- 125 -
Figura 4.8. Esquema de los dominios conservados predichos en la HK SMc02367.	- 126 -
Figura 4.9. Esquema de los dominios conservados predichos en el RR SMc02366.	- 126 -
Figura 4.10. Análisis genómico comparativo de la región que contiene a SMc02366 de <i>E. meliloti</i> 2011.	- 130 -
Figura 4. 11. Análisis de la velocidad máxima de crecimiento de las cepas mutantes en medio GS con y sin el agregado de 2mM Cu ⁺² .	- 131 -
Figura 4. 12. Capacidad de mutantes derivados de <i>E. meliloti</i> 2011 para crecer en TY agarizado con altas concentraciones de cobre (II).	- 132 -
Figura 4. 13. Aminoácidos conservados en la región sensora de HKs ortólogos a SMc02367.	- 133 -
Figura 4. 14. Capacidad de mutantes derivados de <i>E. meliloti</i> 2011 para crecer en TY agarizado con altas concentraciones de hierro(III) y aluminio (III).	- 133 -
Figura 4. 15. Tolerancia a polimixina B de los mutantes del TCS SMc02366/SMc02367 derivados de <i>E. meliloti</i> 2011.	- 135 -

Figura 5. 1. Esquema de trabajo realizado para la identificación y cuantificación diferencial de proteínas.	- 144 -
Figura 5. 2. Gráfico tipo volcano plot utilizado en la visualización de proteínas diferencialmente expresadas.	- 145 -
Figura 6. 1. Diseño experimental realizado para la identificación y cuantificación diferencial de metabolitos de Eme wt y Eme Δ RR cultivados en medio ácido o neutro.	- 170 -
Figura 6. 2. Análisis de componentes principales (PCA) de metabolitos intracelulares de Eme wt y Eme Δ RR cultivadas a pH ácido o neutro.	- 172 -
Figura 6. 3. Análisis de tipo heatmap de los metabolitos identificados y cuantificados en células de Eme wt cultivadas a diferentes pHs.	- 173 -
Figura 6. 4. Análisis de tipo heatmap de los metabolitos identificados y cuantificados en células de Eme Δ RR cultivadas a diferentes pHs.	- 174 -
Figura 6. 5. Esquema que relaciona compuestos intermediarios de las principales vías catabólicas de <i>E. meliloti</i> .	- 180 -
Figura 6. 6. Esquema que relaciona las principales vías de síntesis y degradación de aminoácidos y metabolitos relacionados presentes en <i>E. meliloti</i> 2011 y los posibles cambios detectados en células de Eme Δ RR cultivadas en acidez.	- 183 -
Figura 7. 1. Evaluación de la capacidad de mutantes de <i>E. meliloti</i> 2011 para colonizar la raíz de alfalfa en experimentos de competición frente a la cepa salvaje.	- 193 -
Figura 7. 2. Estimación de la eficiencia simbiótica entre alfalfa y <i>E. meliloti</i> 2011 salvaje y los mutantes isogénicos.	- 195 -
Figura 7. 3. Corte longitudinal semifino de un nódulo de <i>M. sativa</i> inducido por <i>E. meliloti</i> 2011 mutante en el RR SMc02366.	- 197 -
Figura 7. 4. Detalle aumentado de la zona III de nódulos inducidos por <i>E. meliloti</i> 2011 salvaje o mutantes.	- 198 -
Figura 7. 5. Micrografías TEM de la zona III de nódulos inducidos por <i>E. meliloti</i> salvaje o mutantes.	- 200 -
Figura 7. 6. Secciones longitudinales de nódulos maduros de <i>M. sativa</i> inducidos con <i>E. meliloti</i> salvaje fotografiados usando un microscopio confocal después del ensayo de tinción vivo/muerto.	- 203 -
Figura 7. 7. Secciones longitudinales de nódulos maduros de <i>M. sativa</i> inducidos con <i>E. meliloti</i> 2011 wt y cepas mutantes fotografiados usando un microscopio confocal después del ensayo de tinción vivo / muerto.	- 204 -

Indice de tablas

Tabla 2. 1. Bases de datos on line y herramientas bioinformáticas utilizadas	- 70 -
Tabla 2. 2. Cepas de colección y plásmidos utilizados en este trabajo	- 72 -
Tabla 2. 3. Lista de mutantes utilizada para la búsqueda de RRs implicados en la tolerancia a estrés.	- 72 -
Tabla 2. 4. Lista de primers utilizados en este trabajo.	- 74 -
Tabla 2. 5. Lista de metabolitos utilizados como estándares de referencia en el análisis GC-MS/MS realizado en células de <i>E. meliloti</i> 2011.	- 87 -
Tabla 4. 1. Lista de mutantes utilizados para la búsqueda de RRs implicados en la tolerancia a estrés.	- 115 -
Tabla 4. 2. Listado de los mutantes generados mediante delecciones “limpias” de los elementos del operon.	- 124 -
Tabla 4. 3. Predicción de homología/estructura utilizando métodos computacionales.	- 129 -
Tabla 5. 1. Lista de proteínas de Clase I reprimidas en el mutante Eme Δ RR.	- 154 -
Tabla 5. 2. Lista de proteínas de Clase I sobre-expresadas en el mutante Eme Δ RR.	- 155 -
Tabla 5. 3. Proteínas de Clase II. Proteínas presentes o ausentes (on/off) en Eme Δ RR (respecto a Eme wt).	- 158 -
Tabla 6. 1. Metabolitos diferencialmente representados en cultivos de Eme wt a pH ácido (pH= 5,6) con respecto a Eme wt pH= 7,0	- 175 -
Tabla 6. 2. Metabolitos diferencialmente representados en cultivos de Eme Δ RR a pH ácido (pH= 5,6) con respecto a Eme Δ RR pH= 7,0.	- 176 -
Tabla 6. 3. Metabolitos diferencialmente representados en cultivos a pH ácido (pH= 5,6) de Eme Δ RR con respecto a Eme wt, cuyos cambios en condiciones ácidas están relacionados a la presencia del RR SMc02366	- 177 -

Introducción general

Capítulo 1

1.1. Producción primaria de alimentos en el marco de una agricultura sustentable

El nitrógeno (N) es uno de los elementos más importantes en los sistemas biológicos e integrante de biomoléculas esenciales. Tal como sucede con el resto de los elementos químicos, en el medio ambiente se presenta en diversas formas. En la naturaleza se halla principalmente en forma gaseosa y compone aproximadamente el 79% de la atmósfera. A pesar de la gran abundancia de este elemento en la atmósfera y rocas sedimentarias, el N es uno de los nutrimentos más limitantes en los ecosistemas terrestres y acuáticos debido a que su forma gaseosa inerte (N_2) no es utilizable por la mayoría de los organismos vivos a excepción de los microorganismos fijadores de nitrógeno (Dalton y Kramer 2006). El N es un elemento que restringe el crecimiento de plantas ya que éstas sólo son capaces de incorporarlo en sus formas reducidas (combinadas). Por ello, con el fin de aumentar los rendimientos, en la agricultura habitualmente se suplementa el nitrógeno de manera exógena. Este proceso se conoce como fertilización.

La síntesis industrial de los fertilizantes nitrogenados está basada en el proceso Haber-Bosch, proceso que utiliza alta presión y temperatura para la generación de amoníaco (NH_3) a partir de N_2 e hidrógeno (H_2). Las grandes cantidades de fertilizantes que se han conseguido gracias a este desarrollo, han sido clave para aumentar la producción de alimentos que llevó a la población a duplicarse en los últimos 50 años (Smil 1999). Sin embargo, los costos ecológicos asociados a la producción y utilización masiva de estos fertilizantes químicos se evidencian hoy en día en el suelo, agua y aire. En primer lugar, el proceso Haber-Bosch involucra la generación de 275 toneladas anuales de dióxido de carbono (CO_2) a expensas de energías no-renovables e involucra anualmente la quema del 3% del gas natural del mundo (Olivares *et al.* 2013). En segundo lugar, la proporción de los fertilizantes asimilados por los cultivos es baja (se estima en un 35%) y el remanente de los compuestos nitrogenados escurre a las napas superficiales y aguas subterráneas hasta llegar a los ríos y lagos causando la eutroficación de los mismos (Fowler *et al.* 2013; Vance 2001). Además, el exceso de nitrógeno reducido que no asimilan las plantas queda en el suelo y es asimilado por las bacterias nitrificantes y denitrificantes generando gases de NO_x y N_2O como productos de su metabolismo. La liberación de estos gases a la atmósfera contribuye al efecto invernadero, la

destrucción de la capa de ozono y a la lluvia ácida (Galloway *et al.* 2003) que constituyen un riesgo para el medio ambiente.

Frente a esta problemática ambiental y considerando que se calcula que la población aumente de los 7200 millones a 9500 millones de habitantes para el año 2050, nos enfrentamos a 3 grandes desafíos: aumentar la producción de alimentos para satisfacer el crecimiento de la población; llevarlo a cabo de una manera ambientalmente sustentable; y garantizar una distribución justa de los alimentos (von Braun 2007). En este contexto, uno de los mayores intereses de la comunidad científica está enfocado en el estudio y optimización del proceso biológico por el cual ciertos organismos reducen el N_2 a NH_3 y lo incorporan en moléculas orgánicas, conocido como Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN).

1.2. La Fijación Biológica de Nitrógeno

La FBN puede ser llevada a cabo por microorganismos que tienen la capacidad de convertir enzimáticamente el N_2 atmosférico (químicamente inerte por la naturaleza del triple enlace N-N) en variantes reducidas. Los microorganismos diazótrofos (*di*: dos; *azo*: nitrógeno; *trofo*: alimento) son aquellos que poseen las enzimas necesarias para llevar a cabo la reducción del N_2 . Este proceso está catalizado por un complejo de metalo-enzimas conocido comúnmente como nitrogenasa. Las bacterias que llevan a cabo esta reducción enzimática deben desarrollar formas de vida donde la presión parcial de oxígeno (O_2) es muy baja o incluso nula, ya que este gas inhibe irreversiblemente a la nitrogenasa.

Los microorganismos responsables de la FBN no constituyen un grupo taxonómico homogéneo, sino que están ampliamente distribuidos en grupos parafiléticos de bacterias y algunas arqueobacterias con diferentes estilos de vida y metabolismos (aerobios, anaerobios, autótrofos, heterótrofos, metanótrofos, en vida libre y en simbiosis) (Raymond *et al.* 2004). De acuerdo al ambiente en el que consiguen la reducción de los niveles de O_2 , los organismos diazotróficos pueden clasificarse en **a)** Fijadores en vida libre, como bacterias de los géneros *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, y *Klebsiella*; **b)** Fijadores asociados, que pueden fijar nitrógeno sólo en ambientes de microaerofilia generados por la presencia de la raíz de la planta asociada; y finalmente los **c)** Fijadores simbióticos, que sólo son capaces de fijar nitrógeno cuando se encuentran formando parte de una relación simbiótica con una planta huésped. Son parte de este último grupo algunos géneros de

actinomicetes (*Frankia*) y de cianobacterias (*Anabaena* y *Nostoc*), y el conjunto de α y β -proteobacterias conocidos como rizobios que son capaces de establecer simbiosis con plantas leguminosas (Wagner 2011).

1.2.1. Contribución de la FBN en el ciclo del nitrógeno y en la fertilidad de los suelos

El 30% del total del nitrógeno que es introducido a la biósfera por medio de la FBN corresponde a nitrógeno reducido por asociaciones simbióticas de cultivos sembrados y otro 30% proviene de los mismos procesos que ocurren en pastos (Paul 1988). Estos porcentajes ilustran la importancia de la FBN en el ciclo de nitrógeno. La explotación y optimización de este proceso natural es clave para disminuir los 80 millones de toneladas de fertilizantes químicos que se utilizarán en los próximos diez años (Peoples *et al.* 1995) y en la restauración de las tierras que han sido severamente dañadas (Burris 1994).

La simbiosis rizobio-leguminosa es la fuente principal de la generación de nitrógeno asimilable en tierras arables (Tate 1995). Por ese motivo, la introducción de especies leguminosas en los campos es la estrategia más saludable para mejorar la fertilidad de los suelos. Se estima que el aumento de los rendimientos de los cultivos en tierras previamente sembradas con leguminosas es equivalente a los que se obtiene al aplicar entre 30 y 80 kg de fertilizantes químicos por hectárea (Wani *et al.* 1995). Además, existen estudios que indican que la intercalación de cultivos de maíz (*Zea mays*) con la planta leguminosa de maní (*Arachis hypogaea*) en una relación 1:4, es equivalente a la aplicación de 96 kg por hectárea de fertilizantes químicos (Mandimba 1995).

En bosques y pantanos, las asociaciones de actinomicetes (*Frankia* spp.) con angiospermas no leguminosas son las principales fuentes de introducción de nitrógeno asimilable (Tate 1995) a un nivel comparable a las de la simbiosis rizobio-leguminosa.

1.3. Los rizobios

Los rizobios son bacterias Gram (-), de vida libre no esporulantes que pueden sobrevivir como saprófitos por largos períodos en ausencia de plantas leguminosas y que han adquirido por transferencia horizontal de genes la capacidad establecer una vida en simbiosis con plantas (MacLean *et al.* 2007). Esta forma de vida y la capacidad de adaptarse a un

ambiente heterogéneo y cambiante como el suelo se encuentra reflejado en sus genomas, los cuales son grandes y frecuentemente multipartitos. Los mismos contienen un gran número de genes asociados a un diversos metabolismos y relacionados con la tolerancia a estrés (MacLean *et al.* 2007; Mauchline *et al.* 2006).

Los genes responsables de la fijación de nitrógeno, en general, suelen encontrarse agrupados en plásmidos simbióticos (pSym) o en islas genómicas (SIs, del inglés: *Symbiotic Islands*) (MacLean *et al.* 2007); mientras que los responsables de la tolerancia a estrés suelen estar en el cromosoma o en los plásmidos.

Los rizobios tienen un rango restringido de huésped, es decir, infectan una o unas pocas especies de leguminosas. Inicialmente, esta característica fue utilizada como criterio de clasificación. Actualmente la taxonomía rizobiana es polifásica y se basa en caracteres morfológicos, fisiológicos y moleculares (Lindström y Young, 2009). Dentro de estos últimos, y considerando las incongruencias filogenéticas reportadas entre los genes que constituyen parte del genoma “core” (central y básico) y los genes simbióticos, la reconstrucción de la filogenia de los rizobios debe considerar tres criterios: genes cromosomales comunes del genoma *core* para ubicar su posición filogenética; genes involucrados en la FBN para establecer relaciones con otras bacterias por ser la FBN una característica ancestral de amplio espectro filogenético; y genes de la nodulación por ser buenos marcadores de la co-evolución de los rizobios con su hospedero y su origen geográfico (Wang *et al.* 2000).

Actualmente los rizobios abarcan un grupo de bacterias muy diversas desde el punto de vista taxonómico, metabólico y genético debido a que, en los últimos años, el número de especies descritas se ha incrementado rápidamente y la clasificación se ha vuelto más compleja. A pesar que la taxonomía de los rizobios es continuamente revisada por el *International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee for the Taxonomy of Rhizobium*, la clasificación actual basada en criterios moleculares, si bien no es definitiva, agrupa a los rizobios en 14 géneros α -proteobacterias: *Agrobacterium* (*Rhizobium*), *Allorhizobium*, *Aminobacter*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium*, *Shinella*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*) y 3 géneros de β -proteobacterias: *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Herbaspirillum* (<http://edzna.ccg.unam.mx/rhizobial-taxonomy>, Weir 2016, de Lajudie & Young, 2017).

Ensifer meliloti, organismo de estudio de este trabajo, pertenece al grupo de las α -proteobacterias y puede establecer simbiosis con leguminosas del género de *Medicago*, *Mellilotus*, y *Trigonella*. Posee un genoma de 6,7 Mb distribuido en tres replicones: un cromosoma de 3,67 Mb y dos megaplásmidos (pSymA y pSymB) de 1,35 y 1,68 Mb, respectivamente (Galibert *et al.* 2001).

1.4. Las leguminosas

Las leguminosas son angiospermas (plantas con flor) que pertenecen a la familia *Leguminosae* (*Fabaceae*) y están comprendidas en tres subfamilias: *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* y *Papilionoideae*. Sus 730 géneros y 19.400 especies registradas a la fecha las posiciona como la tercera familia más grande de angiospermas después de las compuestas (*Asteraceae*) y las orquídeas (*Orchidaceae*).

Las leguminosas presentan una gran variedad de hábitos de crecimiento, pudiendo ser árboles, arbustos o hierbas. Los árboles y arbustos están muy distribuidos en selvas tropicales mientras que las hierbas las encontramos en regiones templadas del planeta (Cronk *et al.* 2004).

Con excepción del género *Parasponia* de la familia *Cannabaceae* (Trinick 1980), las plantas pertenecientes a la familia *Leguminosae* corresponden a la única familia capaz de establecer relaciones simbióticas con rizobios. Esta familia constituye la segunda en importancia agronómica después de las gramíneas aunque sólo una pequeña fracción del total de especies de este grupo es explotado agronómicamente (Gepts *et al.* 2005). En general, las leguminosas de uso agropecuario cumplen una importante función en el enriquecimiento de nitrógeno de los suelos del cultivo.

En particular, la alfalfa (*Medicago sativa*), es una especie alógama autotetraploide que pertenece a la familia de las leguminosas. A nivel local y mundial, la alfalfa es considerada la base forrajera de los sistemas intensivos de producción de carne y leche. El cultivo de alfalfa reúne una serie de características ventajosas entre las que se destacan su alta producción de materia seca, su alto valor nutricional y digestibilidad, y su gran adaptabilidad a distintos tipos de climas. Comparada con otras especies, el forraje de alfalfa tiene un mayor contenido de proteínas. En este marco, el pastoreo de la alfalfa es una estrategia muy interesante asociada a la reducción de costos de la explotación ganadera. Sin embargo, dado

que la alfalfa no persiste mucho tiempo bajo pastoreo continuo, es necesaria la adopción de un sistema discontinuo que permita que las plantas recuperen sus reservas y alcancen la madurez. Desde hace más de un siglo y en forma prácticamente ininterrumpida, Argentina se ha destacado como uno de los mayores productores de alfalfa a nivel mundial. Actualmente, nuestro país posee aproximadamente 3,7 millones de hectáreas de alfalfa sembradas en distintas regiones del país (Centro, NOA, Patagonia y Cuyo). En el área núcleo de Argentina, en condiciones de secano, la alfalfa puede producir entre 8 y 22 toneladas anuales por hectárea de materia seca, dependiendo de la disponibilidad hídrica del año (Racca *et al.* 2001)

La alfalfa puede prosperar en regiones semiáridas, húmedas y subhúmedas. La temperatura óptima para su crecimiento está entre 15°C y 25°C. Se trata de una planta perenne, con tallo erecto de 60 a 100 cm de altura y hojas trifoliadas. Las flores, azules o púrpuras, crecen en forma de racimos y los frutos forman espirales de tres vueltas que encierran 2 a 6 semillas de color marrón claro. Está morfológica y fisiológicamente adaptada para resistir deficiencias hídricas prolongadas debido fundamentalmente a dos motivos: la presencia de raíces que pueden penetrar en profundidad el perfil del suelo y la capacidad de detener su crecimiento cuando las condiciones hídricas no son adecuadas. Es una planta adaptada a suelos bien drenados y alcalinos. Los suelos ácidos suelen ser perjudiciales para el cultivo, principalmente por una baja tolerancia intrínseca de la planta a tal condición y por una disminución de la supervivencia de su simbionte, *E. meliloti*.

1.5. La simbiosis rizobio-leguminosa

La productividad y la calidad nutricional de los cultivos se halla normalmente limitada por la disponibilidad de nitrógeno fijado en suelos de agricultura intensiva. En el último siglo, la fertilización con compuestos nitrogenados sintéticos (principalmente amonio y urea) ha promovido la agricultura notablemente, pero con un alto costo económico y ecológico. Una alternativa sustentable para mitigar la problemática del nitrógeno es la promoción de la FBN mediada por microorganismos conocidos como diazótrofos. En este sentido, la simbiosis rizobio-leguminosa es considerada un pilar fundamental en el ciclo del nitrógeno ya que es la responsable de la incorporación del 40% del total del nitrógeno incorporado a la biosfera (Orive 1983). Esta alta eficiencia de fijación permite prescindir en parte de la administración

de fertilizantes químicos, que son tóxicos y requieren una gran cantidad de combustibles fósiles para su síntesis.

En la actualidad, el 33% del requerimiento dietético de N para humanos se obtiene de las leguminosas, y el 40% del aceite de cocina del mundo proviene de la soja y del maní (O'Rourke *et al.* 2014, Song *et al.* 2016, Zhang *et al.* 2017). Por lo tanto, las leguminosas juegan un papel vital en el mantenimiento de la seguridad alimentaria mundial (Ainsworth *et al.* 2012; Pandey 2016). Además, un cambio en el uso de la tierra cultivada hacia la producción de leguminosas puede aumentar la producción de proteínas necesarias para el consumo humano, aumentar la eficiencia del uso de N y mejorar la fertilidad del suelo (Considine *et al.* 2017; Foyer *et al.* 2016). Sin embargo, la sostenibilidad de la producción de leguminosas se ve amenazada por la creciente incidencia de estreses ambientales (ver la reciente revisión, Abdelrahman *et al.* 2018), incluidas las sequías persistentes, el aumento de la salinidad y acidez del suelo, las olas de calor y las deficiencias nutricionales del suelo (Aranjuelo *et al.* 2014; Kunert *et al.* 2016; Lopez *et al.* 2017).

Como ya mencionamos, en las próximas décadas la producción de leguminosas deberá aumentar para satisfacer las necesidades alimentarias de un mundo más poblado y con menos cantidad de recursos y tierras arables (Graham *et al.* 2003). En este contexto, resulta importante aumentar el uso y los rendimientos de especies leguminosas.

La simbiosis con los rizobios es el resultado de un complejo proceso de diálogo molecular entre los simbioses que comienza previo al contacto de la bacteria con la planta y culmina con la formación de los nódulos radicales fijadores de nitrógeno. En el presente trabajo, se utilizó como referencia al sistema modelo de interacción simbiótica *Ensifer meliloti* - *Medicago sativa*. En las sucesivas secciones del capítulo introductorio se presentan en forma abreviada los aspectos más relevantes de esta interacción con el fin de sentar el marco teórico para el desarrollo de esta Tesis.

1.5.1. Etapas tempranas de la interacción simbiótica *Ensifer meliloti* - *Medicago sativa*

Los primeros estadios de la interacción consisten en un intercambio de señales por los simbioses que ocurre de manera recíproca (Figura 1.1). En condiciones de baja concentración de nitrógeno en el suelo, las raíces de las plantas secretan a la rizósfera un conjunto de compuestos denominados flavonoides, compuestos aromáticos policíclicos

derivados de la 2-fenil-1,4-benzopirona sintetizados por todas las plantas terrestres. Estos compuestos son detectados por los rizobios a través de la unión de sus proteínas NodD (reguladores transcripcionales miembros de la familia LysR) y estas proteínas activan la expresión de un conjunto de genes *nod* (Peck *et al.* 2006) que codifican la maquinaria enzimática encargada de sintetizar los **Factores de Nodulación** (FN). Los FN son lipoquitoligosacaridos constituidos por un núcleo básico de longitud variable de residuos de N-acetil-D-glucosamina enlazados por uniones β -1-4, que contiene un grupo N-acyl sustituyente en el residuo no reductor (Perret *et al.* 2000). Además en el grupo amino correspondiente al azúcar del extremo no reductor se une una marcada variedad de ácidos grasos mediante uniones amida, los cuales, dependiendo de cada FN, tendrán diferente grado de saturación. Sobre esa estructura básica, y dependiendo de la especie de rizobio, se encuentran modificaciones o sustituciones muy variadas tanto en el extremo reductor como en el no reductor. Estas variaciones definen gran parte de la especificidad de especies que se observa en la simbiosis (Perret *et al.* 2000). Las proteínas codificadas por los genes bacterianos *nodA*, *nodB* y *nodC* están involucradas en la biosíntesis de la estructura del núcleo básico de los FN. Adicionalmente los FN presentan modificaciones de naturaleza variable (sulfurilaciones, acetilaciones, carbamilaciones y metilaciones entre otras) en diferentes posiciones del núcleo básico. La introducción de grupos sustituyentes y las modificaciones químicas realizadas al ácido graso acoplado a la glucosamina terminal en el núcleo básico, son ejecutadas por proteínas codificadas por otro grupo de genes *nod* (*nodEF*, *nodG*, *nodH*, *nodPQ*, *nodL*, etc) y por genes *noe* y *nol*.

Es precisamente esta variación uno de los factores que determina las diferentes especificidades entre especies de rizobios y de leguminosas (Lerouge *et al.* 1990). Es importante mencionar que una especie de rizobio puede sintetizar una familia de FN, dificultando así la predicción del rango de huéspedes a partir de la estructura de los FN que produce un rizobio en particular. La detección de los FN por parte de la planta es mediada por los receptores de múltiples dominios extracelulares pertenecientes a la familia LysM (como por ejemplo el receptor *Medicago truncatula Nod factor perception*, MtNFP, ilustrado en la Figura 1.1), que se encuentran expuestos en la superficie externa de los pelos radiculares (Garg 2007). Estos inducen respuestas de la planta que son esenciales para que ocurra posteriormente el ingreso de las bacterias a la raíz. La respuesta más temprana es un

aumento de la concentración de iones Ca^{+2} intracelular en el pelo radical, seguida por oscilaciones en la concentración de este ion que conducen a una reorganización del citoesqueleto (Oldroyd 2004). Como consecuencia de esa reorganización se forma lo que se conoce como **enrulado radicular**, un rulo en el extremo del pelo radicular que “atrapa” a las bacterias adheridas a la superficie del mismo (Esseling *et al.*, Lhuissier, y Emons 2003; Oldroyd 2004).

Simultáneamente, los FN estimulan a las células de la corteza de la raíz para que reinicien mitosis y den lugar al **primordio nodular**. Estas células recibirán a los rizobios que llegan desde los pelos radiculares y darán origen al nódulo fijador de nitrógeno (Timmers *et al.* 1999).

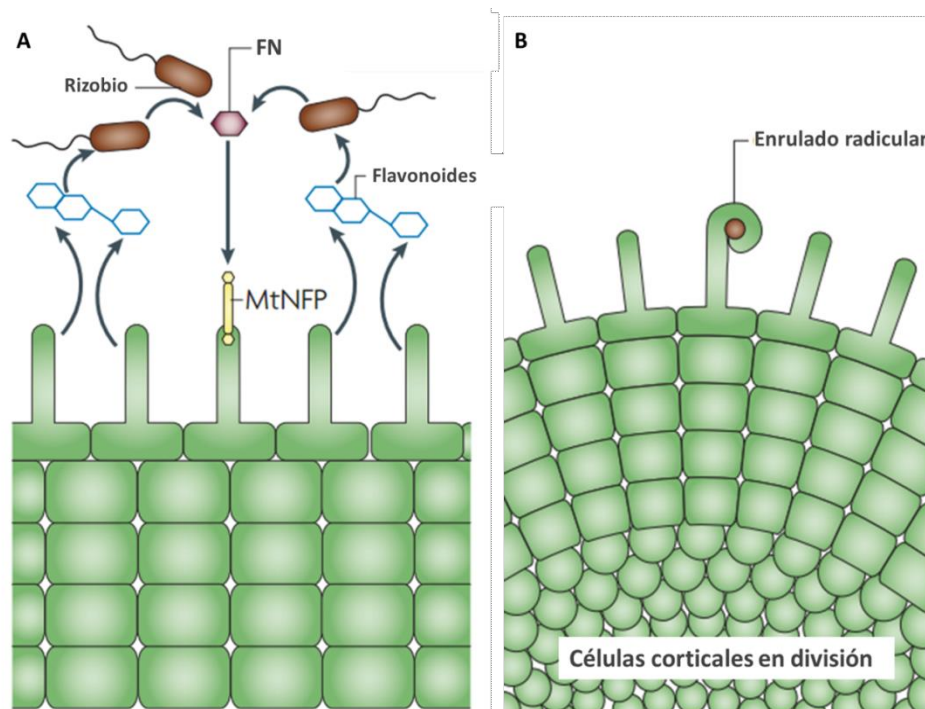


Figura 1. 1. Etapas tempranas de la interacción rizobio-leguminosa.

Los flavonoides liberados por la planta son detectados por los rizobios y éstos sintetizan factores de nodulación (FN) que son detectados por receptores de la planta (A). En consecuencia, los FN estimulan la formación del enrulado radicular y la división de las células corticales que darán origen al primordio nodular (B). Esquema adaptado de Jones *et al.* (2007).

1.5.2. Formación y progresión del hilo de infección

Una vez que los pelos radiculares fueron colonizados, comienza el proceso de infección hacia el centro del tejido radicular (Figura 1.2). Para llegar a destino, las bacterias progresan por

estructuras tubulares conocidas como **hilos de infección**. El desarrollo de estas estructuras es el resultado la invaginación de la membrana y pared celular del pelo radicular en respuesta a los FN y a los exopolisacaridos (EPS) que liberan los rizobios en la punta del hilo de infección (Gage 2004), y a las citoquinas vegetales que contribuyen el direccionamiento (Tirichine *et al.* 2007). El desarrollo del hilo de infección permite el movimiento de las bacterias atrapadas en el enrulado hacia la corteza de la raíz. *E. meliloti* produce dos tipos de exopolisacáridos: exopolisacarido I (EPSI) o succinoglicano, y exopolisacárido II (EPSII) o galactoglucano. Ambos EPS facilitan la formación del hilo de infección, aunque el primero es más eficiente que el segundo en mediar dicha formación en *M. sativa*.

El enrulamiento solo se produce en unos pocos pelos localizados en una zona radicular que es susceptible a los rizobios, mientras que la mayoría de los pelos radiculares de esta zona muestran un comportamiento alterado o deformado.

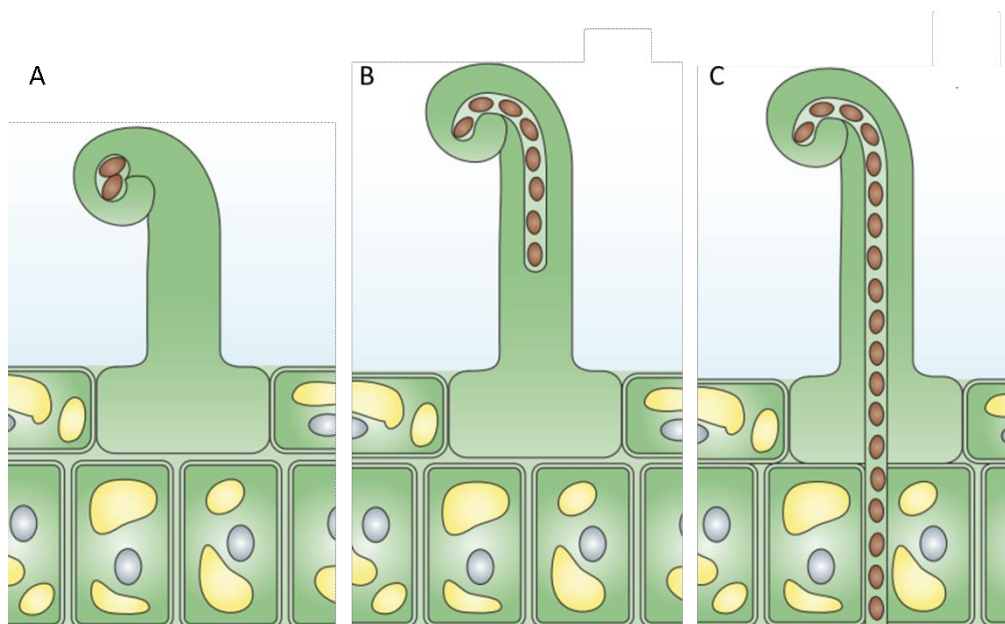


Figura 1. 2. Desarrollo y progresión del hilo de infección.

Luego que los rizobios son atrapados por el enrulado radicular **(A)**, comienza la infección de rizobios mediante el desarrollo de hilos de infección en respuesta a los factores Nod y EPS bacterianos **(B)**. Los hilos de infección son direccionados hacia las células del córtex donde los rizobios son liberados en respuesta a citoquinas **(C)**. Esquema adaptado de Jones *et al.* (2007).

Antes de que el hilo de infección alcance las células de la base del pelo radicular, las células corticales de la raíz son inducidas a diferenciarse activando su ciclo celular y causando su división para formar el primordio nodular. En el caso de los nódulos indeterminados, como

los que se desarrollan en alfalfa y que describiremos en la Sección 1.5.5, los hilos de infección deben crecer por sobre la zona meristemática nodular para llegar a las zonas subyacentes. Una vez que las bacterias llegan a destino, son internalizadas por las células corticales dando lugar a estructuras formadas por una célula vegetal que contiene una célula bacteriana en su interior denominada **simbiosomas**. En nódulos indeterminados, la célula bacteriana y la membrana que la rodea se dividen sincrónicamente antes que la bacteria se diferencie. En el lumen del simbiosoma, o espacio peribacteroidal, se han encontrado enzimas que poseen pH óptimo ácido. Esto ha llevado a considerar al simbiosoma como una estructura derivada de una vacuola lítica, haciendo un paralelismo con el lisosoma de células de mamíferos (Mellor 1989). Recientemente, sin embargo, dicho punto de vista respecto del origen mecanístico de la formación de simbiosomas ha sido cuestionado (Jones et al. 2007).

1.5.3. Supervivencia del rizobio en el simbiosoma y posterior diferenciación

La sobrevivencia del rizobio y su diferenciación dentro del simbiosoma dependen tanto de factores propios como de factores de la planta. Como consecuencia del proceso de diferenciación celular, dentro del simbiosoma el rizobio experimenta marcados cambios fisiológicos. Las plantas que generan nódulos indeterminados imponen un programa de endoreduplicación genómica del rizobio (Vinardell *et al.* 2003) a fin de aumentar indirectamente su tasa metabólica.

En las bacterias Gram negativas en general, uno de los principales mecanismos de defensa contra el medio extracelular está vinculado con los lipopolisacáridos (LPS) de membrana. Los LPS constituyen el componente principal de la membrana externa bacteriana y están compuestos por un lípido A anclado a membrana, un *core* de oligosacáridos y un antígeno-O cuya longitud depende de la especie bacteriana.

En los rizobios, ya ha sido descrito que una adecuada síntesis de LPS es importante para la supervivencia dentro del simbiosoma y para su posterior diferenciación a bacteroide. En *E. meliloti*, por ejemplo, el gen *bacA* es importante en la correcta síntesis del lípido A y las cepas mutantes en este gen se lisan al poco tiempo de ser endocitadas sin llegar a diferenciarse a bacteroides (Ferguson *et al.* 2004; Glazebrook *et al.* 1993). En el mismo sentido, los mutantes de *lpsB* (que codifica para una glicosil transferasa involucrada en la biosíntesis del componente polisacárido del *core*) sobreviven en el simbiosoma a tal punto que logran comenzar la diferenciación a bacteroide pero se lisan antes de lograr completar

el proceso de FBN (Campbell *et al.* 2002). Este mutante se encuentra afectado en la competitividad por la ocupación frente a la bacteria salvaje en nódulos de *Medicago sativa* pero mantiene la capacidad de fijar nitrógeno en este huésped (Lagares *et al.* 1992). Sin embargo es incapaz de fijar nitrógeno en *Medicago truncatula* (Niehaus *et al.* 1998), sugiriendo además que las diferentes plantas requieren diferentes estructuras para avanzar en el proceso simbiótico.

Por otro lado, el mantenimiento de la homeostasis de ciertos iones también está vinculado con la supervivencia del rizobio en el simbiosoma. Por ejemplo, se han descrito al gen *sitA* y al grupo de genes *pha*, que codifican para un transportador de manganeso y para una bomba de expulsión de K^+ respectivamente, como relevantes para la supervivencia del bacteroide (Davies *et al.* 2007; Putnoky *et al.* 1998).

Cuando las bacterias alcanzan las células corticales a través del hilo de infección y logran sobrevivir el ambiente del simbiosoma, comienzan a diferenciarse a bacteroide. Esta diferenciación implica una duplicación del material genético sin división celular, lo que deriva en un aumento de volumen de la célula. Los bacteroides de *E. meliloti*, por ejemplo, aumentan su tamaño entre 5 y 10 veces, y su material genético más de 24 veces. Este aumento del material genético y del tamaño celular se considera que es clave para aumentar la tasa metabólica y satisfacer la demanda energética de la fijación de nitrógeno (Galitski *et al.* 1999; Mergaert *et al.* 2006). Dicho aumento del material genético ocurre de manera desorganizada en el nucléolo, impactando en la correcta formación del *septum* y en la división equitativa del genoma (Mergaert *et al.* 2006). Como resultado, la diferenciación a bacteroide en *E. meliloti* es irreversible.

1.5.4. Expresión de la nitrogenasa, reducción del nitrógeno y FBN

La nitrogenasa es un complejo multienzimático constituido por dos componentes, una Fe-proteína que es codificada por los genes *nifH* y una molibdeno-hierro (Mo-Fe)- proteína codificada por los genes *nifD* y *nifK*. Una característica muy importante de este complejo enzimático es su alta sensibilidad al oxígeno (O_2), inactivándose de forma irreversible, e incluso inhibiéndose su síntesis. La protección de la nitrogenasa al oxígeno se debe a diferentes mecanismos que incluyen la síntesis de la leghemoglobina, nodulina tardía, asociada a la membrana que rodea al bacteroide. La leghemoglobina es una hemoproteína con hierro, cuyo grupo hemo es sintetizado por la bacteria y la porción proteica es

sintetizada por la planta. Esta proteína suministra O_2 al bacteroide a una tasa apropiada para que sea empleado de forma óptima como aceptor terminal de electrones y, simultáneamente, permite que exista una baja tensión de oxígeno que no repercuta en la actividad de la nitrogenasa. Debido a las grandes cantidades de leghemoglobina, el interior del nódulo efectivo es de color rosa.

La expresión del complejo de la nitrogenasa y de las enzimas necesarias para llevar a cabo la respiración microaeróbica en el bacteroide, es controlada por una cascada regulatoria que se activa por la percepción de bajos niveles de O_2 por el sistema de dos componentes integrado por las proteínas FixJ y FixL. En términos generales, el sistema FixJ/FixL induce la expresión de las proteínas FixK y NifA, las cuales activan la expresión de los genes *fix* y los genes *nif* respectivamente. Así mismo, la expresión de los genes *nif* está positivamente regulada por el hambreado de N a través del factor σ^{54} (Fischer 1994). Estos cambios transcripcionales en el rizobio diferenciado están acompañados por cambios que conllevan a una regulación negativa en la mayoría de otros procesos metabólicos, direccionando así el metabolismo de la bacteria para llevar a cabo de forma casi exclusiva la FBN. La FBN es catalizada por el complejo de la nitrogenasa de acuerdo a la siguiente ecuación:



Los bacteroides dependen totalmente de la planta para obtener la energía necesaria para fijar el nitrógeno. Los principales compuestos orgánicos transportados al interior de los bacteroides a través de la membrana peribacteroidal son los intermediarios del ciclo del ácido cítrico, en particular los ácidos de cuatro carbonos como succinato, malato y fumarato. Éstos ácidos son utilizados como donadores de electrones para la producción de ATP. El producto que se obtiene de la actividad nitrogenasa es el amonio, que se asimila formando glutamato y glutamina, aminoácidos precursores de proteínas. En las leguminosas de origen templado el nitrógeno es exportado principalmente en forma de glutamina y asparagina, representando este último entre un 60%-70% de total de compuestos nitrogenados exportados. Aunque la proporción entre las distintas amidas puede variar, estos tipos de leguminosas exportan amidas independientemente de si obtienen el nitrógeno o no a través de la FBN.

1.5.5. Nódulos determinados e indeterminados

La organogénesis del nódulo radicular comienza con la formación del primordio nodular en respuesta a los FN liberados por los rizobios y continúa con la llegada de los mismos por el hilo de infección. Según su origen filogenético, las leguminosas pueden dar origen a dos versiones de nódulos completamente distintos en su morfología e histología.

Al igual que la leguminosa *M. Sativa*, las plantas que pertenecen al clado IRLC (del inglés, *Inverted Repeat Lacking Clade*) desarrollan **nódulos indeterminados**. En estos nódulos, el primordio nodular da origen a un meristema apical que continuamente genera poblaciones de células que serán infectadas por los rizobios que llegan desde el hilo de infección. Para aumentar el número de simbiosomas, en estos tipos de nódulos existe una división sincrónica de la bacteria y de la membrana que la rodea. El aumento del número de células infectadas resulta en un crecimiento continuo del nódulo dando lugar a órganos cilíndricos y elongados. Debido a esta característica, en los nódulos indeterminados maduros se distinguen 4 zonas: zona I, meristema apical; zona II, zona de infección; interzona II-III, caracterizada por la presencia de gránulos de almidón; zona III, zona de fijación de nitrógeno; zona IV, región de senescencia (Figura 1.3-B). La infección rizobiana ocurre en células de la zona II al recibir simbiosomas provenientes de los hilos de infección. Las células vegetales infectadas comienzan a diferenciarse y aumentan su tamaño gradualmente en concordancia con un incremento de ciclos de endoreplicación del material genético. En algunos casos, se ha observado que llegan a tener un tamaño 80 veces mayor que las células del meristema (Cebolla *et al.* 1999). En la zona III es donde ocurre la reducción del nitrógeno en los bacteroides maduros y la zona IV es una región ocupada por células senescentes con menor tasa de fijación de nitrógeno. Las especies *Medicago*, *Pisum*, *Vicia*, *Galega* y *Astagalus* desarrollan nódulos de tipo indeterminado.

En los **nódulos determinados**, en cambio, el meristema da origen a un grupo de células que se infectan por rizobios y luego desaparece como tal. Esas células luego aumentan su tamaño de manera sincrónica y dan origen a un nódulo esférico (Figura 1.3-A). Es para destacar también que, a diferencia de los primeros, los rizobios que habitan estos tipos de nódulos no endorepican su genoma y su diferenciación a bacteroide es reversible. Es decir, tienen la capacidad de generar nuevas poblaciones de células cuando se reaislan a partir de estos tejidos. Desarrollan este tipo de nódulos especies de *Lotus*, *Phaseolus*, *Glycine* y *Vigna*.

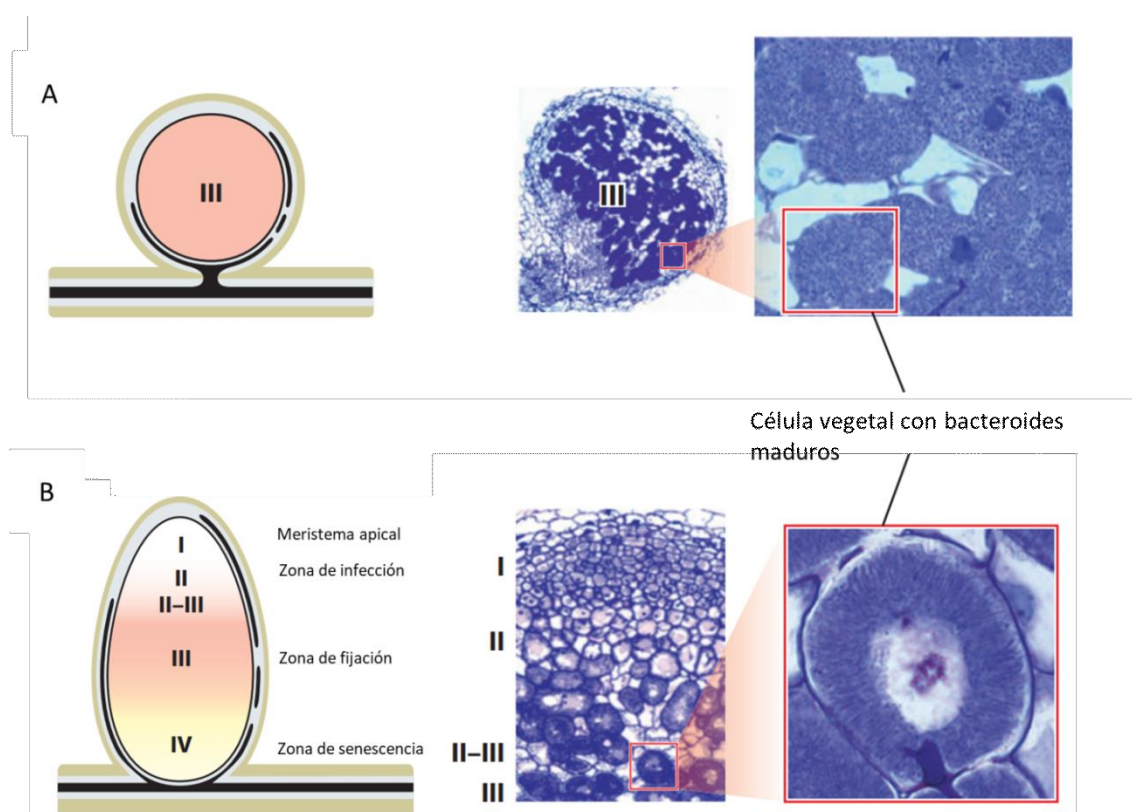


Figura 1. 3. Estructura de nódulos determinados e indeterminados.

Los nódulos determinados (A) son esféricos y la región central (III) contiene células infectadas y no infectadas por bacteroides. Los nódulos indeterminados (B) son alargados y se pueden distinguir zonas con distintos estadios de diferenciación además de la zona III. Modificado de Kondorosi *et al.* (2015)

1.6. La influencia del ambiente en la simbiosis

Como hemos mencionado anteriormente, el establecimiento de las simbiosis fijadoras de nitrógeno rizobio-leguminosa es la consecuencia de una compleja serie de acontecimientos ordenados de comunicación y diferenciación entre ambos simbioses para llegar posteriormente a la formación de nódulos radicales ocupados por rizobios encargados de

fijar N_2 atmosférico. En este contexto, la forma en que cada participante de la simbiosis percibe al otro está siempre condicionada por el entorno químico y el espacio físico en el que se encuentran. Entonces, ¿de qué manera los diferentes factores ambientales afectan al metabolismo de los rizobios, a la generación de las señales simbióticas, o a la comunicación entre las contrapartes simbióticas? Durante la preinfección, cuando los rizobios todavía no han ingresado aún a la raíz de la planta huésped, factores ambientales tales como temperatura, salinidad, pH (entre otros) pueden ser condicionantes absolutos del establecimiento y desarrollo de la simbiosis. El suelo en particular, y el medio ambiente en términos más genéricos, deben ser considerados por lo tanto como partícipes inseparables de este proceso simbiótico. Hoy en día contamos con abundante información sobre el modo en que diferentes tipos de suelo y de estreses ambientales modifican a cada uno de los simbioses y a su propia comunicación (Zahran 1999). Como veremos en las secciones siguientes, el factor ambiente agrega una variable compleja y poco susceptible de generalizaciones en el esfuerzo de comprender el proceso simbiótico en condiciones naturales.

1.7. El concepto de estrés bacteriano

Tanto la viabilidad del rizobio en el suelo como cualquiera de las etapas de la simbiosis descritas anteriormente pueden estar comprometidas por condiciones ambientales que son restrictivas para el crecimiento, la viabilidad o la misma interacción simbiótica, imponiendo así una limitación al desarrollo y establecimiento de los simbioses en el suelo. A estas situaciones se las conoce comúnmente como situaciones de estrés. La definición de estrés ha sido ampliamente debatida, debido a la multiplicidad de interpretaciones que de la misma se generan. Stortz y Hengge-Aronis (Storz y Hengge-Aronis 2000) consideran como condición de estrés a toda situación que no es óptima para el desarrollo y modifica de algún modo la velocidad de crecimiento del organismo en consideración.

Algunas respuestas adaptativas al estrés, sin embargo, funcionan de modo tal que no se observa en última instancia cambios en la velocidad de crecimiento. Los contextos adversos que rodean a la célula pueden estimular la expresión de genes vinculados a la adaptación a tales condiciones o en algunos casos pueden derivar en un daño en sus componentes sin

respuestas celulares. Estos autores también consideran a estas cuestiones como situaciones de estrés (Storz y Hengge-Aronis 2000).

Si se tiene en cuenta el 30% del total de suelos del planeta libre de hielo corresponden a suelos ácidos (von Uexküll y Mutert 1995), se puede considerar al estrés ácido como una de las principales situaciones adversas que los rizobios (y las leguminosas) tienen que sobrellevar habitualmente para lograr establecimiento de la simbiosis. Describiremos brevemente los mecanismos generales de tolerancia a este estrés y posteriormente profundizaremos en uno de ellos: los sistemas de dos componentes.

1.8. Tolerancia a estrés ácido en bacterias. Mecanismos implicados en el mantenimiento del pH interno

A diferencia de las células eucariotas que necesitan un medio extracelular con un pH cercano a la neutralidad, las bacterias pueden desarrollarse en un rango amplio de valores de pH externo (pH_e) que varía entre pH 1-3 y pH 10-13 para organismos acidófilos y alcalófilos respectivamente, y pH 5-9 para neutrófilos (incluidos los rizobios). Sin embargo, estos organismos necesitan mecanismos muy eficientes para que el pH interno (pH_i) se mantenga entre 6-6,5 y 7,5-9 para acidófilos y alcalófilos respectivamente, y entre 7,5-7,7 para neutrófilos (Krulwich 2011).

Mantener el pH_i controlado es importante no solo para que las proteínas y enzimas conserven su estructura nativa, sino también para el mantenimiento del potencial electroquímico a ambos lados de la membrana que las bacterias utilizan para obtener energía. Este potencial electroquímico se conoce como fuerza protón motriz (FPM) y está compuesta por dos componentes: el potencial eléctrico de membrana ($\Delta\psi$), y un potencial generado por la diferencia de pH_i y pH_e (ΔpH). Matemáticamente,

$$FPM (mV) = \Delta\psi - 2,3 RT/F \cdot \Delta pH$$

donde R es la constante general de los gases, T es la temperatura absoluta y F es la constante de Faraday.

Se puede considerar entonces que la adaptación a medios ácidos está relacionada directamente con la capacidad de mantener la FPM en valores donde la célula es capaz de utilizar este potencial para obtener energía. A tal fin, los procariotas poseen tanto

mecanismos activos de consumo o eliminación de protones como mecanismos pasivos de exclusión de estos iones.

1.8.1. Mecanismos activos involucrados en el mantenimiento del pH intracelular

Las bacterias neutrófilas que se adaptan a medios ácidos mantienen el pH_i cercano a la neutralidad y más alto que el pH_e . Ante un estrés ácido, la principal estrategia utilizada por las bacterias para sostener dicha condición se basa en la regulación coordinada de los procesos de la cadena transportadora de electrones asociados a la expulsión y reingreso de protones. *E. coli*, por ejemplo, aumenta la expresión de los complejos de la cadena transportadora de electrones (que bombea protones hacia afuera de la célula) mientras que disminuye la expresión y actividad de la ATPasa (que ingresa protones a la célula durante la síntesis de ATP) (Slonczewski *et al.* 2009). Evidentemente, esta estrategia tiene costos energéticos de importancia, ya que hay menos síntesis de ATP en la respiración celular.

Otra estrategia para mantener el pH_i cercano a 7 está relacionada con la remodelación de ciertas rutas metabólicas a fin de aumentar el consumo de protones intracelulares. Un mecanismo muy estudiado en enterobacterias es la descarboxilación de glutamato y arginina. En particular, la glutamato descarboxilasa es activada por *E. coli* y otras bacterias entéricas al pasar por el estómago. La descarboxilación del glutamato intracelular, a expensas del consumo de un protón (H^+), da lugar a γ -aminoglutarato (GABA). El GABA generado se intercambia por más glutamato del exterior por un transportador GABA/glutamato para recomenzar el ciclo (Gut *et al.* 2006). Por otro lado, también se ha descrito en *E. coli* un aumento de expresión de hidrogenasas que producen, a partir de dos protones, una molécula de hidrógeno que fácilmente puede difundir por la membrana (Noguchi *et al.* 2010).

En algunas bacterias anaeróbicas sometidas a estrés ácido, como en el caso de *Streptococcus mutants*, la expulsión activa de protones del citosol está mediada por el aumento de la actividad de la ATPasa F_0/F_1 (Kobayashi 1986), y por el consumo de los mismos en la conversión de malato a lactato en la fermentación maloláctica (Sheng y Marquis 2007).

1.8.2. Mecanismos pasivos que contribuyen al mantenimiento del pH intracelular

La contribución de tampones citosólicos en el mantenimiento pasivo del pH_i fue propuesta inicialmente por Booth y colaboradores (Booth *et al.* 1985), aunque estudios posteriores no han encontrado una correlación significativa entre el mantenimiento del pH intracelular y la capacidad amortiguadora del citoplasma (Rius y Lorén 1998).

Los mecanismos pasivos de las bacterias que contribuyen a mantener el pH_i están relacionados con cambios en la permeabilidad de la membrana a los protones y con modificaciones en las cargas de la superficie celular que pueden retardar, en parte, la entrada de los mismos al citosol. Por ejemplo, los acidófilos *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Helicobacter pylori* expresan proteínas de superficie cuyos residuos aminoacídicos se protonan en condiciones ácidas y en consecuencia repelen transitoriamente a los protones de la superficie (Chi *et al.* 2007). Con el mismo efecto, *A. ferrooxidans* es capaz además de cambiar la composición de lípidos de superficie en la membrana (Mykytczuk *et al.* 2010).

1.8.3. Regulación de la expresión génica en la homeostasis del pH intracelular

En las secciones anteriores se expusieron los distintos mecanismos vinculados al mantenimiento del pH intracelular. Los mismos contribuyen directamente a la adaptación celular y requieren de componentes especializados que detecten la elevada concentración de protones del exterior y ejecuten una respuesta. Por ejemplo, el sistema GABA/glutamato de *E. coli* está regulado por más de 15 proteínas entre las que se encuentran diversos factores σ , reguladores transcripcionales del tipo AraC y LuxR y proteínas de señalización que unen AMP cíclico. Además, en la respuesta al estrés ácido participan al menos dos **sistemas de dos componentes** (*Two Component Systems, TCS*). Estos son mecanismos de traducción de señales que detectan una condición particular y responden produciendo cambios en la expresión génica. El mecanismo intrínseco de tales sistemas involucra cambios conformacionales de las proteínas y la consecuente transferencia de la información entre sus componentes por medio de fosforilaciones y defosforilaciones. En las secciones siguientes, se ahondarán sus modos de acción, organización y la regulación de su actividad.

1.9. Sistemas de dos componentes bacterianos

Todos los organismos tienen la capacidad y la necesidad de comunicarse con el medio que los rodea. Esto es importante principalmente para los microorganismos, cuyo hábitat suele estar sujeto a cambios de manera constante y repentina. En particular, las bacterias han desarrollado sistemas modulares que les permiten detectar cambios en las condiciones de su entorno y responder de manera coordinada para adaptarse al nuevo escenario. Cada uno de estos sistemas está conformado a menudo por dos proteínas, por lo que se los conocen como **TCS**. Un TCS típico está constituido por una **histidina quinasa (HK)** y una **proteína reguladora de respuesta (RR)**, quienes en conjunto le permiten a la célula detectar señales ambientales y responder de manera adaptativa mediante cambios en la expresión génica. Los TCS constituyen los principales sistemas de transducción de señales en bacterias, y están presentes en casi la totalidad de las mismas.

Las HKs, generalmente ancladas a la membrana, detectan una condición de cambio en el ambiente y transfieren la información a los segundos componentes, los RRs. Estos últimos por lo general son reguladores transcripcionales que modulan la expresión génica y dan lugar a un nuevo fenotipo de adaptación.

Los TCS constituyen los actores principales en varios aspectos de la fisiología bacteriana. En la bibliografía se pueden encontrar TCS involucrados en la utilización de diversas fuentes de carbono y nitrógeno, la asimilación de fosfato, la resistencia a agentes nocivos, o en el desarrollo de formas de vida más especializadas como esporas o biopelículas (*biofilms*). Curiosamente los TCS, típicamente procariotas, han sido adoptados por organismos eucariotas para realizar funciones de señalización, pero con notables adaptaciones en arquitectura, organización y funcionamiento con respecto a los sistemas bacterianos. Si bien podemos encontrar TCS distribuidos en muchos filos de procariotas y eucariotas, están ausentes en mamíferos. Esta propiedad los convierte en interesantes blancos de acción de nuevos antibióticos.

El análisis de la vasta información genómica disponible, ha permitido detectar que existe una correlación directamente proporcional entre el número de TCS presentes en sus genomas bacterianos y los diversos ambientes que habitan estos organismos (Michael y Galperin 2006). Por ejemplo, el parásito intracelular obligado *Mycoplasma genitalium* no posee TCS;

Escherichia coli tiene alrededor de 30 HKs y 32 RRs; *Bacillus subtilis*, 36 HKs y 34 RRs; *Anabaena* sp, 131 HKs y 80 RRs; *Myzococcus xanthus*, 132 HKs y 119 RRs; hasta los casi 200 TCSs que poseen bacterias del género *Streptomyces*, que habitan en suelo (Mascher *et al.* 2006).

1.9.1. Transferencia de la información a través de módulos

Para sobrevivir y adaptarse, las células deben monitorear constantemente las condiciones externas para ajustar su estructura, fisiología y comportamiento. Estos procesos adaptativos son el resultado de una compleja red que involucra proteínas sensoras y reguladoras. Para ilustrar de manera simple el modo de acción de estas proteínas, se puede pensar en una transferencia de la información a través de módulos o regiones donde dicha comunicación puede ocurrir mediante cambios conformacionales de las proteínas (transferencia en *cis*) o mediante la transferencia de grupos fosfato (transferencia en *trans*). Un TCS típico está compuesto por 4 módulos agrupados en los dos componentes como esquematiza la Figura 1.4. El **módulo sensor** de una HK detecta una señal activadora y la información es transferida en *cis* hacia el **módulo transmisor**. Este módulo luego se autofosforila a expensas de ATP en una histidina conservada y transfiere el fosfato al **módulo receptor** del RR (transferencia en *trans*). La información continúa su camino en *cis* hacia el **módulo efector** que es el encargado de montar una respuesta específica a la señal de origen. La respuesta estará relacionada con la activación o represión de genes específicos o bien con modificaciones de actividades enzimáticas presentes en el módulo efector.

Existen a su vez variantes de HKs y RRs un poco más complejas. Las histidina quinasas híbridas (HKh) por ejemplo, además de sus módulos sensor y transmisor poseen un módulo receptor que interviene en la transferencia de la información en *trans* (Figura 1.5). En cuanto a los RRs, es frecuente encontrar dos o más módulos receptores en tándem.

Muchos autores se refieren a los TCS como Sistemas de Fosforelevo (*Phosphorelay Systems*) debido a la mencionada propiedad de estos sistemas de transferir grupos fosfato de módulo en módulo.

Si bien describir el modo de acción de los TCS a través de módulos es rudimentario, permite desentenderse en una primera instancia de dominios y motivos proteicos que muchas veces no son tan fáciles de evidenciar. En las siguientes secciones nos referiremos a ellos.

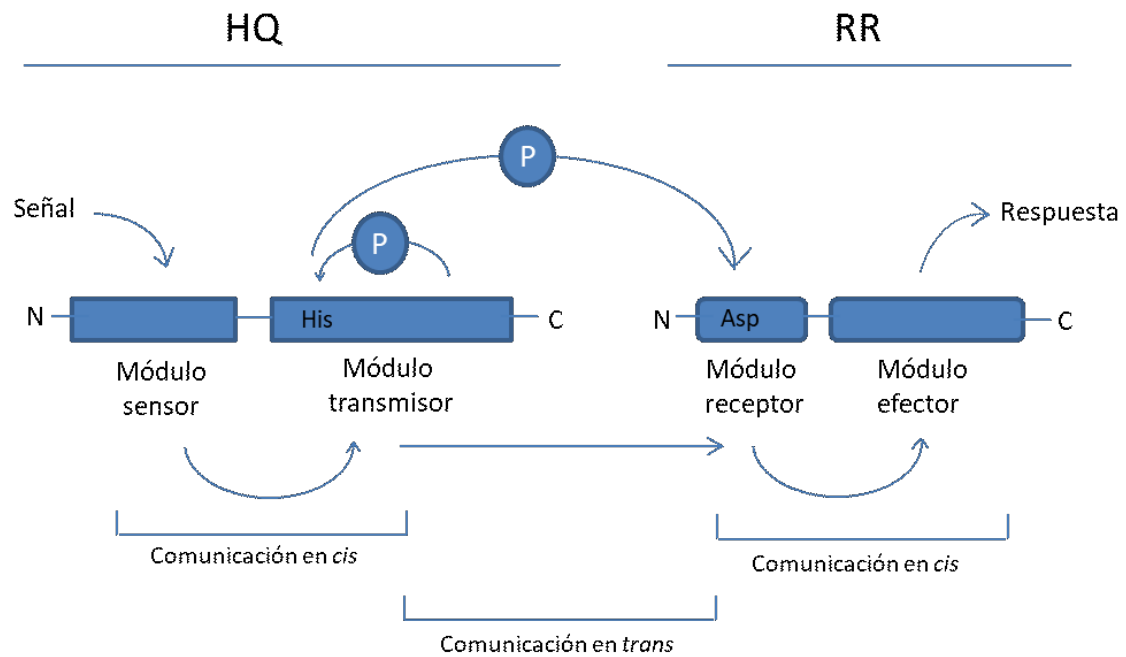


Figura 1. 4. Esquema del modo de acción de una HK y un RR en un TCS típico.

Se ilustra la transferencia de la información en *cis* y en *trans* a través de módulos de acuerdo a si la misma ocurre intra- o inter- proteínas, respectivamente.

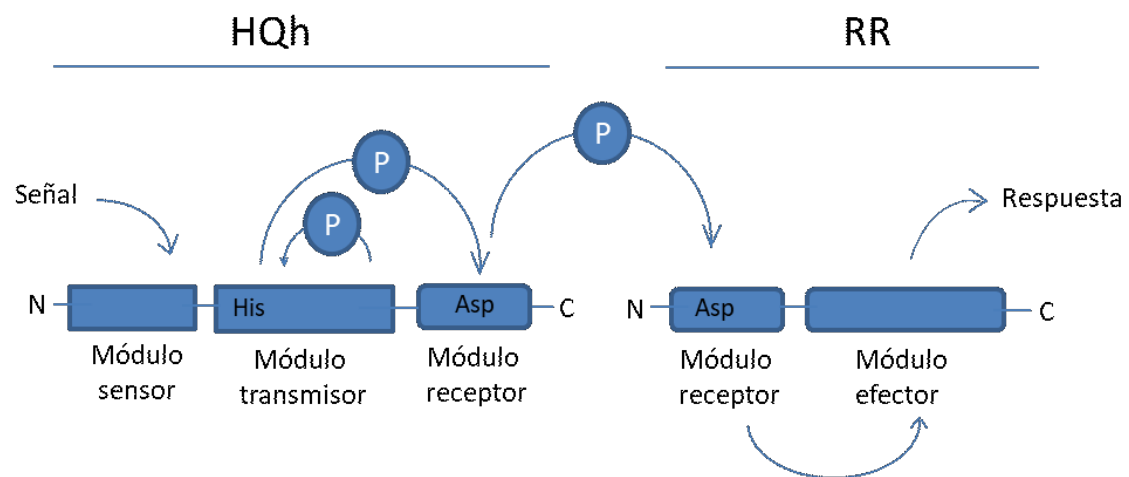


Figura 1. 5 Esquema ilustrativo de la organización de los módulos en una Histidina quinasa Híbrida (HQh).

1.9.2. Histidina quinasas

Las histidina quinasas son proteínas multidominio con una considerable variedad arquitectónica en toda la familia (Bhate *et al.* 2015). En esta sección describiremos brevemente los dominios que comúnmente se encuentran en estas proteínas.

1.9.2.1. Dominios presentes en los módulos sensores

El módulo sensor de las HKs (Figura 1.6) contiene elevada variabilidad en estructura a nivel interespecie y localización, lo que dificulta la identificación y asignación de dominios conservados. Los distintos módulos sensores pueden ser citoplasmáticos o tener motivos que atraviesan la membrana una, dos y hasta diez veces, aumentando la complejidad de la cuestión. De todas formas, se han descrito dominios sensores conservados como PAS y HAMP.

El motivo estructural denominado **PAS** (Per/ARNT/Sim) (Huang 1993) aparece formando parte de numerosas HKs, contiene una típica conformación de hélices α que flanquean cinco láminas β plegadas antiparalelas. Sin embargo, sólo en algunos casos se ha demostrado que este motivo estructural es un dominio sensor funcional, como ocurre en las quinasas PhoQ, DcuS, y CitA; que detectan iones divalentes, C4-dicarboxilatos, y citrato, respectivamente.

En otros casos, el motivo PAS se asocia con moléculas que actúan como grupo prostético y éste es el que percibe el estímulo. Uno de estos casos es el sistema FixL/FixJ de *E. meliloti*. La HK FixL constituye un sensor de oxígeno intracelular. Esta quinasa contiene un motivo PAS localizado en la región citosólica de la proteína que oportunamente se inactiva al asociarse con un grupo hemo-ferroso conteniendo O₂ (Miyatake *et al.* 2000). A pesar de detectar la señal en la región citosólica de la proteína, FixL de *E. meliloti* es una proteína integral de la membrana. Sin embargo las HKs FixL homólogas de *Bradyrhizobium japonicum* y *Rhizobium etli*, especies filogenéticamente cercanas a *E. meliloti*, son proteínas solubles.

El dominio **HAMP** (Aravind y Ponting 1999) lo podemos encontrar en proteínas histidina quinasas, adenilil ciclasas, proteínas de quimiotaxis y fosfatasas (*Histidin-kinases*, *Adenilil ciclasas*, *Methyl-accepting chemiotaxis* y *Phosphatases*). En el caso de las HKs, este dominio suele estar localizado inmediatamente después de una región transmembrana y antes del dominio DHp, del que nos referimos más adelante. Las evidencias indican que este dominio

estaría más involucrado en la transferencia en *cis* entre los módulos sensor y transmisor, que en la detección de la señal (Dutta *et al.* 1999).

Si bien los motivos PAS y HAMP son los dominios sensores más abundantes en HKs, existen al menos 14 dominios sensores diferentes (Ulrich *et al.* 2005). Incluso hay HKs que no contienen ningún dominio sensor evidente. Por ejemplo la HK DesK, que forma parte del sistema DesK/DesR de *B. subtilis*, es un sensor de temperatura que cuenta con 5 regiones transmembranales y ningún dominio sensor predicho mediante secuencia o estructura. El cambio en el estado de fluidez de la membrana provocado por cambios en la temperatura es detectado por las regiones transmembranales de DesK, regulando su actividad quinasa/fosfatasa (Aguilar *et al.* 2001).

1.9.2.2. Dominio transmembrana

En muchas HKs (PhoQ, CitA, LuxQ, EnvZ, etc.) se forma un haz de 4 hélices en la membrana, con dos hélices trans-membrana de cada monómero. En algunos casos, como DesK y FixL, cada monómero tiene múltiples hélices transmembrana (Figura 1.6).

1.9.2.3. Dominios de transducción de señales intracelulares

Estos incluyen una variedad de dominios como HAMP, PAS, GAF y *coiled-coils* que residen en el citoplasma justo debajo del dominio transmembrana (Figura 1.6) y estarían involucrados en la transferencia en *cis* de la información. Estos dominios a menudo existen como combinaciones o repeticiones en tándem y son transductores de señal genéricos que se encuentran en muchas otras proteínas bacterianas y de mamíferos (Bhate *et al.* 2015).

1.9.2.4. Dominios presentes en los módulos transmisores

La conservación evolutiva del módulo transmisor permite diferenciar dos dominios: el dominio **DHp** (*Dimerization and Histidine phosphotransfer domain*) con capacidad de dimerizarse y fosforilarse, y el dominio catalítico (**CA**) también se conocido como dominio **HATPasa_c** (*Histidine Kinase-type ATPase catalitic domain*) por la capacidad de unir ATP (Figura 1.6). Usualmente se dice que las quinasas se autofosforilan porque el dominio CA hidroliza la molécula de ATP que contiene y fosforila a la histidina conservada del dominio DHp. El dominio CA consiste en una estructura tipo sándwich α/β altamente conservada con tres α -hélices empaquetadas contra cinco cadenas beta antiparalelas. El nucleótido se une entre dos hélices y se sostiene mediante un bucle conocido como tapa ATP. Las secuencias

de unión a nucleótido conservadas que comprenden el sitio de unión se denominan cajas N, G1, G2 y F; denominadas así por los residuos críticos dentro de estos sitios (Kim y Forst 2001). Se han dilucidado varias estructuras de dicho dominio tanto por RMN, en el caso de EnvZ (Tanaka *et al.* 1998); como por rayos X, para las HKs PhoQ (Marina *et al.* 2005) y NtrB (Song *et al.* 2004) de *E. coli*; CheA de *Thermotoga maritima* (Bilwes *et al.* 1999); y PrrB de *Mycobacterium tuberculosis* (Nowak *et al.* 2006).

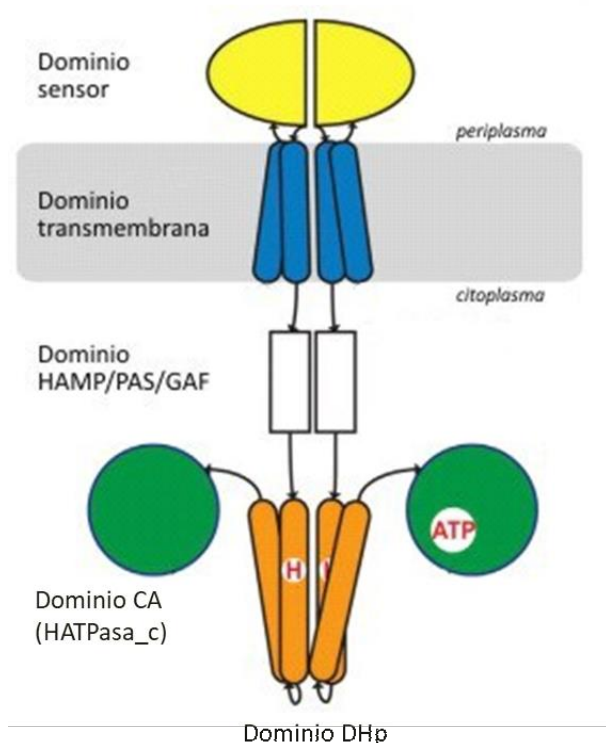


Figura 1. 6. Histidina quinasa típica.

La figura esquematiza una histidina quinasa localizada en la membrana con el dominio sensor en el espacio periplásmico; dominios transmembrana; dominios HAMP/PAS/GAF que conectan el módulo sensor con el módulo transmisor (suelen estar presentes o ausentes); dominios catalíticos (CA) y de dimerización (DHp) que constituyen el módulo transmisor. Se indican además la histidina conservada (H) del dominio DHp y una molécula de ATP en el dominio CA. Modificado de Bhate *et al.* (2015)

1.9.3. Percepción de la señal por las histidina quinasa

La vida del mundo microbiano se caracteriza por la continua interacción entre la célula y su entorno. Como hemos mencionado, las HKs de membrana de los TCS poseen un módulo o región sensora de la señal que puede o no estar anclada a membrana, y una región catalítica constituida por al menos dos dominios catalíticos donde se lleva a cabo la bioquímica de la transferencia de la información (que definimos también como módulo transmisor). En esta sección haremos foco en la primera región, particularmente en lo relacionado a la percepción de la señal que da inicio a la cascada de señalización.

El rol biológico de la traducción de señales por TCSs se pone de manifiesto en el inicio (detección de la señal) y en el final (expresión génica). Por lo tanto, agrupar y clasificar las HKs de acuerdo a sus regiones sensoras de alguna manera reflejaría las funciones de estas proteínas en lo que respecta a la comunicación entre el exterior y el interior celular. Realizar dicha clasificación basada solamente en la diversidad de dominios resulta dificultoso debido a la gran variabilidad presente a nivel de secuencia, topología de membrana y arreglos de dominios. Desde el punto de vista funcional, resulta útil clasificar las regiones sensoras teniendo en cuenta de manera conjunta a todas estas cuestiones. Así, la mayoría de las HKs se pueden clasificar en **a)** HKs que monitorean el espacio periplásmico al poseer la región sensora localizada hacia el exterior celular, y tienen una o dos regiones transmembrana (RTM); **b)** HKs que poseen de 2 a 20 RTM con la detección de la señal vinculada en alguna porción de esa región; y **c)** HKs que poseen, a diferencia de las de las anteriores, la región sensora íntegramente en el interior celular. Las HKs de este último grupo están destinadas a monitorear el interior celular y pueden estar ancladas a membrana o ser íntegramente proteínas citoplasmáticas.

A continuación, describiremos brevemente cada uno de estos grupos.

1.9.3.1. Histidina Quinasas que monitorean el espacio periplásmico

Este grupo es el grupo más numeroso ya que está representado por una HK común compuesta por dos RTM que flanquean la región N-terminal de localización periplásmica que sensa la señal, y una región C-terminal citosólica que forma parte del módulo transmisor (donde ocurre la autofosforilación y transferencia de grupos fosfatos al regulador de respuesta). El rol biológico de estos tipos de HKs es el de transferir información a ambos lados de la membrana plasmática y es por eso que están usualmente vinculados en la detección de solutos y nutrientes en el exterior. Si bien los miembros de este grupo tienen una estructura topológica que es compartida, sus regiones sensoras contienen diversos tipos de dominios que pueden ser usados para clasificarlos en subgrupos, como los dominios PAS (*Period-ARNT-Sim protein*), CHASE (*Cyclase/histidine kinase-associated sensing extracellular*) y CACHE (*Ca⁺² channels, chemotaxis receptors*). La función y el estímulo activador del primer subgrupo ha sido caracterizado en varias HKs.

Como se menciona en otras secciones, la cascada de señalización se inicia mediante la detección de una o varias señales específicas. Estudios mutacionales y de cristalografía han indicado que en algunos casos los ligandos (señales) se asocian electrostáticamente a residuos aminoacídicos específicos de la región sensora. Este es el caso presente en la HK NarX de *S. enterica* que sensa nitrato (Cheung y Hendrickson 2009); y la HK CitA de *E. coli* que sensa citrato (Janausch *et al.* 2002; Stewart 2003).

La HK PhoQ del TCS PhoP/PhoQ de *S. enterica* está involucrada en el proceso de tolerancia a péptidos antimicrobianos y es activada en bajas concentraciones de Mg^{+2} y por la presencia de los propios agentes antimicrobianos. PhoQ posee en su región sensora un dominio PAS que difiere del que posee la HK CitA. Esta versión de PAS, dilucidada por estudios estructurales y no por homología de secuencia, contiene dos α -hélices extras que generan una región cargada negativamente que está en contacto con la membrana. En este sitio es donde se ubican los cationes Mg^{+2} , y en consecuencia la inactivan al privarla de movimiento (Cheung *et al.* 2008). En contrapartida, en una cantidad suficientemente baja de Mg^{+2} esa zona de la proteína tiene libre movimiento y traduce la señal activadora hacia los dominios citosólicos (Cho *et al.* 2006).

La activación de la señal por unión de ligando no ocurre en todos los casos. En la HK VirA de *Agrobacterium tumefaciens* el ligando (arabinosa) se une a una proteína citoplasmática (ChvE) y este complejo es el que interacciona con la región periplásmica sensora (Peng *et al.* 1998). Un ejemplo similar ocurre en la activación del TCS BctD/BctE de *Bordetella pertusis* que induce la expresión de un sistema transporte de ácidos tricarboxílicos de tipo ABC. Las proteínas BctA y BctB constituyen el canal de membrana y BctC capta citrato para transportarlo. A continuación, el complejo BctC-citrato activa la región sensora del TCS BctD/BctE. Así, este sistema modula la expresión génica del mencionado sistema de transporte (Antoine *et al.* 2005).

1.9.3.2. Histidina quinasas que detectan cambios en la membrana plasmática

En este grupo muy diverso de HKs, las hélices de las RTM juegan un rol central en la percepción del estímulo inicial. Estas quinasas pueden tener entre 2 y 20 RTM que se unen entre sí por segmentos cortos de 25-35 aminoácidos. Los miembros de este grupo también se pueden clasificar en subgrupos (Mascher 2014): *i)* pequeñas HKs de bacterias gram-positivas

con 2 RTM, involucrados en el sensado de estrés de membrana o en procesos de detoxificación por medio de transportadores ABC; *ii*) termosensores con al menos 6 RTM; *iii*) HKs homólogas a proteínas de transporte que poseen de 12 a 20 RTM. Los miembros del primer subgrupo son HKs de menos de 400 aminoácidos de longitud. El *loop* extracitoplasmático es de 25 aminoácidos o menos y la región sensora está ubicado en las dos RTM (Mascher *et al.* 2003). Podemos mencionar a las quinasas LiaS de *B. subtilis* y VraS de *Staphylococcus aureus* como miembros representativos de este grupo. La presencia de antibióticos como bacitracina, vancomicina o péptidos catiónicos antimicrobianos produce de alguna manera una situación de estrés de membrana, y esta condición es la detectada por las RTM de estas quinasas (Mascher *et al.* 2004; Pietiainen *et al.* 2005).

Los cambios de temperatura impactan directamente sobre la fluidez de la membrana plasmática. Una disminución de la temperatura produce un cambio entre un estado de cristal líquido desordenado, a una fase tipo gel más rígida y ordenada. Con el objetivo de mantener una membrana funcional, las bacterias bajan el punto de fusión de la misma al aumentar la proporción lípidos ramificados, ya sea por síntesis *de novo* o por modificación enzimática. Existen TCS encargados de regular estas cuestiones, como es el caso del TCS DesR/DesK de *B. subtilis* que estimula la transcripción del gen *des* que codifica para una desaturasa de ácidos grasos (Aguilar *et al.* 2001). El grupo del Dr. de Mendoza (Abriata *et al.* 2017) ha demostrado que el mecanismo sensor está basado en propiedades de la membrana dependientes de la temperatura, muy probablemente una combinación de espesor, fluidez y permeabilidad al agua, y han propuesto posibles mecanismos por los cuales DesK detecta tales propiedades y transduce las señales. Las estructuras de rayos X y los modelos computacionales han permitido revelar las características estructurales de las RTM y regiones citoplasmáticas en los estados quinasa y fosfatasa de DesK. Los experimentos bioquímicos y genéticos y las simulaciones moleculares demostraron además que la formación reversible de una estructura *coiled-coil* de dos hélices en el quinto segmento transmembrana y el extremo N-terminal del dominio citoplásmico son esenciales para los mecanismos de detección y transducción de señales (Cybulski *et al.* 2002; Hunger *et al.* 2004, Inda *et al.* 2016).

Entre las HKs que poseen entre 12 y 20 RTMs, podemos mencionar a CbrA del TCS CbrB/CbrA de *Pseudomonas aeruginosa*. Este TCS controla la expresión de varios genes de

vías catabólicas en respuesta a estímulos que reflejan la relación carbono-nitrógeno intracelular. Cepas mutantes en genes de este TCS están afectadas en la utilización de manitol, glucosa, piruvato y citrato como única fuente de carbono, y en el uso de diversos aminoácidos (arginina, histidina y prolina) como fuente de carbono y nitrógeno (Nishijyo *et al.* 2001). Las regiones sensoras localizadas en las RTM tienen un alto grado de conservación con los dominios presentes en proteínas de transporte de Na^+ /soluto de tipo simporte (Häse *et al.* 2001). Si bien no hay estudios que lo confirmen, se especula que la detección de estos solutos por estas quinasas ocurre simultáneamente durante el transporte de los mismos a través de la membrana.

1.9.3.3. Histidina quinasas que monitorean el interior celular

Las regiones sensoras de las HKs que sensan el interior celular están localizadas en el en el citosol y en general, a diferencia de las demás HKs, forman parte de la región C-terminal. Podemos distinguir 2 clases de este tipo de quinasas: *i)* HKs directamente ancladas a membrana con dominios sensores en la región N- o C-terminal, o *ii)* HKs localizadas de manera libre en citosol.

La HK KdpD del sistema KpdD/KpdE es un buen caso para ejemplificar proteínas del primer caso. Esta quinasa posee una región N-terminal en el interior celular, 4 RTM, y la región N-terminal también en el citosol. El sistema detecta el aumento de la presión osmótica en términos de un aumento de la fuerza iónica, concentración de ATP, y una disminución de iones K^+ . Con respecto a la activación de la quinasa, se sostiene que es en la región C-terminal donde ocurre la detección de la disminución de K^+ (Rothenbücher *et al.* 2006) y que la región N-terminal, a su vez, también juega un rol importante en el mecanismo de la traducción de la señal (Heermann *et al.* 2003). Se ha visto además que el aumento de la fuerza iónica es detectado en las múltiples RTM y no en los dominios N- o C-terminal (Heermann *et al.* 2003). Otro ejemplo de quinasas de este tipo es FixL presente en *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium etli*, *E. meliloti* y otros rizobios. Esta quinasa sensa la disminución de oxígeno en el interior celular y al fosforilar el regulador de respuesta FixJ se inicia la transcripción de genes relacionados con la fijación de nitrógeno. La unión de oxígeno (e inactivación) del sistema ocurre en los grupos hemo presentes en los dominios PAS del dímero que forma FixL (Gong *et al.* 2000; Guimaraes *et al.* 2017).

Por otro lado, las HKs que no están asociadas a membrana pueden detectar analitos que provienen del metabolismo celular o analitos que han difundido la membrana desde el exterior. NtrB de *E. coli* por ejemplo consta de una región N-terminal, que estabiliza la actividad fosfatasa, y un dominio C-terminal donde ocurre el inicio de la señalización por interacción con la proteína PII (Kramer y Weiss 1999). El dominio PAS presente en esta región puede ser el encargado de sensar señales aún desconocidas. Otro ejemplo es la HK17 (EF 1632) soluble de *Enterococcus faecalis* capaz de sensar etanolamina en el citoplasma y activar su utilización (Del Papa y Perego, 2008). Por otro lado, en *Ralstonia eutropha* la expresión de hidrogenasas está regulada por el TCS HoxJ/HoxA en respuesta a H₂. En el sensado de este gas interviene una hidrogenasa (HoxBC) que luego interacciona con la quinasa HoxJ. La presencia de H₂ estimula la actividad fosfatasa y la transcripción de los genes de hidrogenasas al defosforilar el regulador de respuesta (Kleihues *et al.* 2000).

1.9.4. Reguladores de respuesta

1.9.4.1. El dominio REC de los reguladores de respuesta

Los dominios REC (**R**egulator **C**heY-like) forman parte de los módulos receptores de los reguladores de respuesta (RRs). La característica distintiva de estos dominios es la presencia de una estructura conservada que posee 5 vueltas de láminas β rodeadas de otras 5 α -hélices anfipáticas (Figura 1.7). En estos dominios existen algunos aminoácidos conservados que son muy importantes para la transferencia de la información. La transferencia en *trans* está facilitada por un residuo de ácido aspártico conservado en el final de la región C-terminal de $\beta 3$ (residuo que es fosforilado por su HK asociada) y por otros dos residuos ácidos ubicados en el *loop* $\beta 1$ - $\alpha 1$ (contribuyen a la unión de un catión divalente, comúnmente Mg⁺²) (Bellsollell *et al.* 1994). La ganancia (o pérdida) de dicho grupo fosfato deriva en pequeñas modificaciones de la superficie de la región $\alpha 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 5$ que resultan en un cambio conformacional substancial suficiente para la transferencia de la información en *cis* hacia el módulo efector.

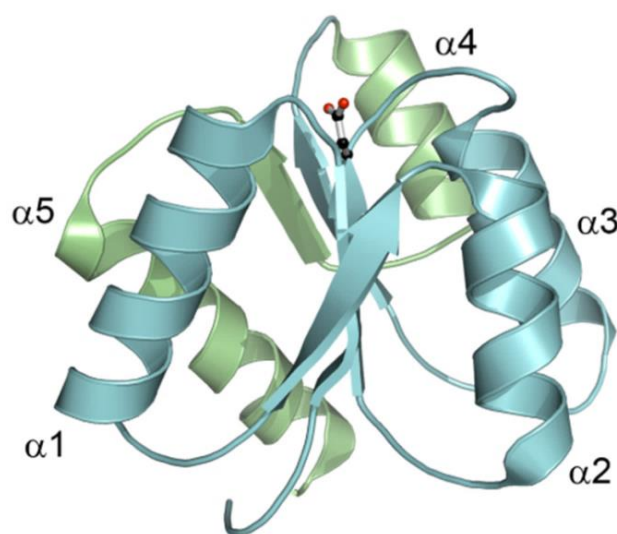


Figura 1. 7. Diagrama de cintas del dominio REC del RR CheY de *E. coli*.

La figura muestra el plegamiento típico de tipo $(\alpha\beta)_5$ del dominio REC (cintas) con el aspartato conservado receptor del grupo fosfato (bolas y palos). En verde se indican los motivos $\alpha 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 5$ que experimentan cambios conformacionales luego de la fosforilación del aspartato (Gao *et al.* 2007).

1.9.4.2. Dominios de los módulos efectores de los reguladores de respuesta

Los módulos efectores de la región C-terminal poseen dominios con gran diversidad de funciones los cuales se los utiliza para clasificarlos en grupos con propiedades compartidas. Entre ellos encontramos dominios con capacidad de unirse a ADN, a ARN o que poseen funciones catalíticas específicas.

La mayoría de los dominios presentes en los módulos efectores poseen actividad de unión a ADN y actúan activando o reprimiendo la expresión de genes específicos. Tal es la gran diversidad de estos dominios, que aún en el mismo subgrupo es frecuente encontrar variaciones en la secuencia de ADN en las que interactúan o en el mecanismo de la regulación de la transcripción.

OmpR por ejemplo, un miembro muy caracterizado que pertenece al grupo más grande de las familias de RRs, actúa tanto como activador como represor transcripcional al regular la expresión diferencial de los genes *ompC* y *ompF* que codifican para porinas de la membrana externa. Estudios cristalográficos han posibilitado determinar que los dominios de unión de a ADN de los miembros de este grupo contienen una hélice que reconoce sitios del zurco mayor del ADN y unos *loops* que hacen lo propio en regiones del zurco menor (Martinez-Hackert y Stock 1997). Sin embargo, no hay una conservación en el mecanismo de la regulación de la transcripción. La transcripción regulada por OmpR implica una interacción con la subunidad α de la ARN polimerasa (Stock *et al.* 2000).

NarL, RR característico de otro subgrupo, está involucrado en la inducción y represión de genes del metabolismo del nitrato. NarL posee 7 sitios de unión a diversos factores que intervienen en la regulación de su actividad y estudios cristalográficos proponen que la unión a ADN se realiza por un plegamiento de 4 hélices que contiene un motivo de tipo *hélix-turn-helix* (Baikalov *et al.* 1996).

El RR **NtrC**, que regula la expresión de genes del metabolismo del nitrógeno, se caracteriza por tener en su región efectora un dominio de unión a ATP y sitios de unión a ADN de tipo *helix-turn-helix*. La fosforilación de este RR favorece la oligomerización en octámeros, la unión a ADN y la hidrólisis de ATP. La energía se invierte en el reclutamiento de la ARN polimerasa σ^{54} y en la activación de la transcripción (Stock *et al.* 2000).

OmpR, NarL y NtrC son los RRs más estudiados en procariotas. Sus estructuras, conservadas en los dominios efectores, se las utiliza para clasificar los RRs de un organismo determinado. En el Capítulo 3 utilizaremos ese criterio para identificar y clasificar los RRs de *E. meliloti*.

Reguladores de respuesta con dominios de unión a ARN

Si bien han sido descritos numerosos dominios de unión a ARN, solo uno es encontrado comúnmente en reguladores de respuesta: ANTAR (Shu y Zhulin 2002). En reguladores transcripcionales del tipo AmiR y NasT, este dominio estimula la transcripción evitando la terminación de la transcripción en terminadores ρ -independientes (O'Hara *et al.* 1999; Shu y Zhulin 2002).

Reguladores de respuesta con dominios de unión a proteínas

En algunos RRs, los dominios efectores ejercen acción a través de interacciones proteína-proteína. Estos incluyen RRs asociados a quimiotaxis del tipo CheV que combinan dominios REC con dominios tipo CheW de unión a proteínas y RRs del tipo Hnr; así como los reguladores de respuesta que contienen dominios PAS, GAF, TPR o HPt como únicos dominios de salida. Si bien los dominios PAS y GAF son conocidos por unir ligandos, la transducción de señales probablemente involucre sus interacciones con otros dominios proteicos que no están asociados a la unión de ligandos.

Reguladores de respuesta con dominios efectores que poseen actividad enzimática

Mediante la secuenciación de la proteína de quimiotaxis CheB, se dilucidó que esta posee un dominio REC (N-terminal) y un dominio con actividad metilesterasa (C-terminal). Este dominio C-terminal es capaz de retener su actividad catalítica en ausencia del dominio REC o cuando este es fosforilado (Lupas y Stock 1989). Estudios posteriores revelaron otros RRs que contienen el dominio REC y dominios asociados con otras actividades enzimáticas. Por ejemplo, RRs tipo PleD (Aldridge y Jenal 1999; Aldridge *et al.* 2003) tienen un dominio de efector de tipo GGDEF, que tiene actividad diguanilato ciclasa (Chan *et al.* 2004); mientras que los RR de tipo VieA combinan el dominio REC con el dominio EAL, que tiene actividad de fosfodiesterasa específica de c-di-GMP, y un dominio de unión a ADN (Tischler y Camilli 2004). RRs de estos tipos se encuentran presentes en varios linajes filogenéticos

1.9.5. Modulación de la actividad de los TCS por proteínas accesorias

La gran mayoría de los RRs son activos cuando están fosforilados (Hoch 2000). En consecuencia, cualquier condición o factor celular que impacte sobre el estado de fosforilación tendrá un impacto directo sobre la respuesta. Como es de esperar, el mecanismo de acción de los TCS de procariotas es más complejo que la sola acción de una HK que sensa una señal y un RR que lleva a cabo una respuesta. En esta sección haremos mención a las llamadas **proteínas accesorias**, factores que actúan a distintos niveles de la cascada de señalización contribuyendo en la detección de la señal, estimulado fosforilaciones o defosforilaciones, o actuando por interacción directa con algunos de los actores de los TCS.

1.9.5.1. Contribución de las proteínas accesorias a las primeras etapas de la señalización

En ocasiones, la cascada de señalización incluye proteínas accesorias que pueden formar parte del sensado de la señal o de la integración de la misma. Por ejemplo, en el sistema de fosforelevo Rcs de bacterias entéricas, la lipoproteína de membrana RcsF es la encargada de detectar la señal y mediar la fosforilación de la HK RcsC, con la consecuente activación del sistema. El resultado es la expresión de genes vinculados con la formación de *biofilms*, movilidad, y la producción de polisacáridos extracelulares (Clarke 2010). Los transportadores de tipo ABC también han sido descritos como complejos de membrana vinculados con la señalización por TCS. Se ha descrito que el transporte activo de bacitracina por el

transportador BceAB de *B. subtilis* es el encargado de activar el sistema BceS/BceR constituyendo así una efectiva estrategia de detoxificación de péptidos antimicrobianos (Dintner *et al.* 2011). En enterobacterias, se han detectado al menos 70 genes de sistemas de tipo ABC localizados adyacentes a componentes de TCS, hecho que indica que esta modalidad de integrar la señalización es común en estas especies.

Existen también péptidos solubles de localización periplasmática o citoplasmática con un rol activo en el inicio de la señalización. En *A. tumefaciens* por ejemplo, la activación del TCS VirA/VirG (que resulta en la expresión de los genes de virulencia) ocurre en parte por la interacción física de ChvE, una proteína de periplasma que actúa luego de unir carbohidratos exudados por la planta (Nair *et al.* 2011). En relación a las proteínas accesorias que actúan en el citoplasma, podemos mencionar a la proteína PII que modula la activación de la HK NtrB en *E. coli*. Esta proteína es uridilada y desuridilada por una enzima específica en respuesta a situaciones de bajo o alto nitrógeno respectivamente (medido en términos de concentración de glutamina) (Jiang *et al.* 1998). Otro ejemplo de proteínas accesorias citoplasmáticas con acción regulatoria sobre un TCS es la proteína FixT que actúa sobre el sistema FixL/FixJ de *E. meliloti*. Como hemos mencionado anteriormente, este TCS induce la fijación de nitrógeno en respuesta a la disminución de la tensión de oxígeno en el nódulo. FixT tiene acción inhibitoria sobre el inicio de la señalización al evitar la autofosforilación de FixL (Garnerone *et al.* 1999).

1.9.5.2. Modulación del estado de fosforilación de HKs y RRs por proteínas accesorias

La respuesta llevada a cabo por un regulador puede estar determinada no solo por la presencia de señales iniciadoras de la cascada, sino también por factores que tienen acción sobre la fosforilación de sus componentes. Estos factores proteicos pueden actuar de diversas formas y a distintos niveles de la traducción de señales.

En ocasiones, las proteínas accesorias actúan como **proteínas conectoras** al conectar o vincular dos o más sistemas de respuesta. Estas proteínas conectoras generalmente son inducidas por mecanismos moleculares que responden a señales distintas a las que responde el TCS que son capaces de modular, resultando en la integración de varias señales conectadas entre sí con acción directa sobre un RR.

En la literatura encontramos muchos ejemplos de proteínas que actúan estimulando fosforilaciones o defosforilaciones en HKs o RRs, modificando la actividad de los dominios efectores de los reguladores, o conectando e integrando dos sistemas de respuesta.

En *B. subtilis*, la fase de esporulación está fuertemente controlada por 5 HKs (KinA, KinB, KinC, KinD, y KinE) que poseen la capacidad de fosforilar el sistema de fosforelevo Spo0F-Spo0B-Spo0A. La Spo0A fosforilada es finalmente la encargada de mediar la expresión de genes vinculados con la esporulación, entre otros (Piggot y Hilbert 2004). Se han identificado factores que actúan en los distintos niveles de esta cascada de señalización y que tienen un impacto indirecto sobre la fosforilación y activación de Spo0A. Por ejemplo, en situaciones donde la maquinaria de replicación de ADN se ve alterada, se estimula la expresión de la proteína conectora SpdA que tiene efecto inhibitorio sobre la fosforilación de la quinasa KinA. En consecuencia, se inactiva el sistema de fosforelevo y la célula no entra en fase de esporulación. También existen proteínas conectoras que actúan en las últimas etapas del sistema, como las proteínas de las familias Rap y Spo0E, que experimentan actividad fosfatasa sobre los reguladores Spo0F y Spo0A respectivamente. Las proteínas Rap y Spo0E aumentan en situaciones de vida no adversas, por lo que la esporulación no ocurre (Hoch 2017; Perego y Brannigan 2001; Smits *et al.* 2007).

La proteína conectora PmrD de *S. enterica* está bajo control del TCS PhoP/PhoQ y estabiliza la versión fosforilada del regulador de respuesta PmrA (PmrA-P) del TCS PmrA/PmrB. La HK PmrB responde a la presencia de extracelular de Fe^{+3} , Al^{+3} (Wösten *et al.* 2000), o pH ácido (Perez y Groisman 2007) y activa la expresión génica al fosforilar PmrA. En ausencia de estas señales, sin embargo, se favorece la actividad fosfatasa de PmrB sobre PmrA-P y la transcripción se inhibe a menos que PmrA-P se vea estabilizada por PmrD. La transcripción de *pmrD* se activa por el sistema PhoP/PhoQ en condiciones de bajas concentraciones de Mg^{+2} . De esta manera, la resistencia a polimixina se establece no sólo en condiciones ácidas, de alto Fe^{+3} o Al^{+3} , sino también en ambientes de bajo Mg^{+2} (Kox, Wösten y Groisman 2000).

El reclutamiento del complejo de la ARN polimerasa por un regulador transcripcional en su forma activa también pueden ser modulados por proteínas accesorias. Por ejemplo, en *E. coli* la proteína TorI hace lo propio al impedir que el regulador de respuesta TorR interaccione con las subunidades de la ARN polimerasa. De esta manera, la transcripción de

genes del metabolismo anaerobio que controla el TCS TorS/TorR se inhibe (Ansaldi, Theraulaz y Mejean 2004).

Finalmente, los TCS no son una excepción dentro de la organización tridimensional celular (Lazzaro et al. 2017). Los TCS involucrados en el control de la división celular, la diferenciación, quimiotaxis y virulencia, muestran una localización específica y dinámica en su participación en el programa espacial de la célula bacteriana.

Como hemos detallado en este capítulo, el estudio de los TCS ha demostrado que estos sistemas representan una compleja y dinámica red de percepción y respuesta a estímulos. Por otro lado, su extensa distribución entre grupos de organismos diferentes, así como su participación en la detección y respuesta a estímulos diversos, reflejan la gran versatilidad de estos circuitos de señalización. La caracterización detallada a nivel estructural, bioquímico y genético de estos sistemas bacterianos ha permitido por un lado dilucidar un panorama (aún incompleto) de su funcionamiento y ha resaltado su relevancia en diferentes grupos de procariontes.

Para todos los TCS, la elucidación de la naturaleza de la/s señal/es percibida/s así como el estudio de las respuestas cruciales para la regulación de la expresión génica que esta genera (en los diversos ambientes que las bacterias ocupan) siguen siendo un importante foco de estudio. Futuras investigaciones para abordar estos temas muy probablemente revelarán aspectos fascinantes de esta familia de proteínas de señalización. Dicho conocimiento, podría permitir avanzar en el desarrollo de nuevas estrategias para mejorar o inhibir la interacción de la planta con microorganismos agronómicamente importantes.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La hipótesis general de este trabajo consiste en que los procesos regulatorios mediados por sistemas de dos componentes juegan un rol activo en la cascada de señalización intracelular y en el ajuste fino de la expresión de la información génica en rizobios, tanto en vida saprofítica, como en simbiosis con su planta hospedadora y en su alternancia como parte del ciclo de vida de la bacteria.

En particular, existen ciertos sistemas de dos componentes que poseen un rol relevante en la biología de *E. meliloti* en condiciones de bajo pH.

Objetivos

A- Objetivo general

Caracterización molecular y funcional de un sistema de dos componentes de *Ensifer meliloti* relacionado con la tolerancia a estrés abiótico, particularmente a bajo pH, en vida libre y simbiótica.

B- Objetivos específicos

- 1) Utilización de herramientas bioinformáticas para la identificación y caracterización de sistemas de dos componentes presentes en *E. meliloti*.
- 2) Inactivación de reguladores de respuesta en *E. meliloti*.
- 3) Determinación y caracterización del fenotipo de los mutantes en condiciones normales y de estrés. Selección de un mutante de interés para el estudio de su rol en vida libre.
- 4) Caracterización de el o los metabolismos regulados por las vía de transducción de señales iniciada por el sistema de dos componentes seleccionado mediante la cuantificación de los cambios de expresión de proteínas, cambios en los metabolomas bacterianos y otros fenotipos.
- 5) Determinación de la relevancia del sistema de dos componentes seleccionado en la vida simbiótica.

Materiales y métodos

Capítulo 2

2.1. Procedimientos microbiológicos

2.1.1. Cultivos bacterianos y condiciones de cultivo

A continuación se muestran los medios de cultivo utilizados para los ensayo de esta tesis. En todos los casos, para la preparación de los mismos, el material a utilizar se esterilizó durante 20 minutos a 120 °C en autoclave.

Los antibióticos fueron adicionados a los medios de cultivo a partir de una solución madre concentrada con respecto a la concentración final de uso. Las soluciones se prepararon en agua y se esterilizaron por filtración a través de membranas de nitrocelulosa de 0,2 µm de tamaño de poro. Para *E. coli* los antibióticos utilizados fueron: kanamicina, 50 µg/ml; estreptomicina, 100 µg/ml; gentamicina, 10 µg/ml. Para *E. meliloti* los antibióticos utilizados fueron: neomicina, 120 µg/ml; estreptomicina, 400 µg/ml; gentamicina, 50 µg/ml (para TY) y 10 µg/ml (para el medio mínimo GS).

Medio LB

Para el crecimiento de cepas de *E. coli* se utilizó el medio de cultivo LB (Bertani 1951), de la siguiente composición: glucosa, 1g/l; NaCl, 5g/l; triptona, 10g/l; extracto de levadura, 5g/l; agar (para medio sólido), 15g/l.

Los cultivos se incubaron por el tiempo requerido a 37 °C con agitación (180 rpm). La estimación del número de bacterias se realizó por medición fotométrica de la densidad óptica a 600 nm (una $DO_{600} = 0,1$ corresponde a aproximadamente a 2×10^7 UFC/ml) o alternativamente realizando un recuento de viables como se indica en la Sección 2.1.3.

Medio TY

Para el caso de *Ensifer meliloti* 2011 salvaje y mutantes, los cultivos se incubaron a 28 °C con agitación (180 rpm). Para el crecimiento se utilizó medio rico TY (Beringer 1974) ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,9 g/l; triptona, 5 g/l; extracto de levadura, 3 g/l; agar (para medio sólido), 15 g/l) y medios mínimos GS o Evans que se describen más abajo.

La estimación del número de bacterias se realizó por mediciones de DO_{600} (utilizando la relación de que una $DO_{600} = 0.1$ corresponde a aproximadamente 1×10^8 UFC/ml) o alternativamente realizando un recuento de viables como se indica en la Sección 2.1.3.

Medio mínimo GS

Para evaluar el comportamiento de *E. meliloti* 2011 y mutantes a pH=7,0 y pH=5,6 en se utilizó medio mínimo GS (Del Papa *et al.* 1999) cuya composición es:

Compuesto	Concentración
Sacarosa	10 g/l
Glutamato de sodio	0,5 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 mM
CaCl ₂ ·H ₂ O	1 mM
KH ₂ PO ₄	150 µM
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	150 µM
Na ₂ SO ₄	700 µM
H ₃ BO ₃	48 µM
MnSO ₄ ·7H ₂ O	10 µM
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1 µM
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,5 µM
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,5 µM
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1,75 µM
FeCl ₃ ·6H ₂ O	1 µM
Tiamina	2,95 µM
Ácido pantoténico	4,2 µM
Biotina	0,082 µM

Alternativamente, se adicionó al medio buffer biológico PIPES (piperazina-1,4-bis(2-ácido etansulfónico, 20mM), MES (2-(N-morfolino) ácido etansulfónico, 20mM) para equilibrar el mismo a un pH=7,0 o pH=5,60, respectivamente.

La estimación del número de bacterias se realizó por mediciones de DO₆₀₀ (utilizando la relación de que una DO₆₀₀ = 0.1 corresponde a aproximadamente 1×10⁸ UFC/ml) o alternativamente realizando un recuento de viables como se indica en la Sección 2.1.3.

Medio mínimo Evans

El medio mínimo Evans (Evans 1970) utilizado para los estudios de la respuesta a la tolerancia a la acidez (ATR) contiene:

Composición (g/l) del medio de cultivo Evans	
Glucosa	10
PO ₄ H ₂ Na anhidro	0.6
ClNH ₄	0.7
KCl	0.3725
Na ₂ SO ₄	0.142
Ac. Cítrico	0.21
Cl ₂ Mg·6H ₂ O	0.127
Sol. Micronutrientes	5 ml
Sol. Vitaminas	1 ml
Sol. Calcio	1 ml
H ₂ O	hasta 1000 ml

Soluciones de micronutrientes (gr/l)(200X)	
FeCl ₃ ·6H ₂ O	5.4
MnCl ₂ ·4H ₂ O	2
ZnO	0.412
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.219
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.452
H ₃ BO ₃	0.64
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.004
HCl	4 ml
H ₂ O	hasta 1000 ml.

Solución de vitaminas (mg/l)(1000X)	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	274
Riboflavina	20
Ac. p-aminobenzoico	20
Piridoxina-HCl	20
Tiamina-HCl	20
Biotina	20
H ₂ O	hasta 1000 ml

Solución de calcio (20 mM)(1000X)	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,94
H ₂ O	hasta 1000 ml

Alternativamente se utilizó PIPES, MES o HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxietil) piperazin-1-y etanosulfónico) 20 mM para ajustar el pH a 7; 6,1; o 4,0; respectivamente.

La estimación del número de bacterias se realizó por mediciones de DO_{600} (utilizando la relación de que una $DO_{600} = 0.1$ corresponde a aproximadamente 1×10^8 UFC/ml) o alternativamente realizando un recuento de viables como se indica en la Sección 2.1.3.

2.1.2. Curvas de crecimiento y utilización de antibióticos

Las curvas de crecimiento realizadas en el *screening* de posibles mutantes afectados en la tolerancia a la acidez fueron realizadas en erlenmeyers o pocillos de placas multiwell. Para esta última técnica, se partió de diluciones 1:50 de cultivos previamente crecidos en medio GS pH=7,0. Para la medición se utilizó un lector de microplacas multifuncional (BMG Labtech). Las lecturas de DO_{600} se realizaron cada una hora.

2.1.3. Técnica utilizada para el recuento de bacterias viables

La técnica utilizada está adaptada de la técnica de recuento en gota (Herigstad *et al.* 2001). A partir de una muestra líquida conteniendo bacterias viables, se realizan diluciones seriadas 1/10 en tubos tipo Eppendorf utilizando solución fisiológica o alternativamente solución de Fåhræus. En placas de medio agarizado, se colocan gotas (10 μ l) de las diluciones realizadas. Se calcula la media (y su desviación estándar) del recuento de colonias que crecieron en las gotas. Para estimar la cantidad de UFC/ml de la muestra a evaluar, se refiere el promedio calculado al volumen plaqueado y a la dilución que le corresponde. Para lograr una significancia estadística de la técnica, se plaquean entre 6 y 10 gotas por dilución.

2.1.4. Curvas de muerte para evaluar la respuesta de tolerancia a la acidez (ATR)

Para evaluar la adaptación a la acidez de tipo ATR en las cepas estudiadas en este trabajo, a partir de cultivos saturados en medio Evans pH=7,0 se realizaron nuevos cultivos hasta alcanzar una $DO_{600}=0,2$ en medio Evans pH=7,0 o pH=6,1. Alcanzada esa densidad se centrifugó una alícuota del cultivo a 14000g por 5 min a temperatura ambiente, se las resuspendió en el mismo volumen de medio Evans pH=4,0 y se las incubó a 180 rpm a 28 °C. A partir del momento de la resuspensión en medio ácido (tiempo cero), se extrajeron muestras seriadas cada hora a las que, previa dilución en medio Evans a pH 7, se les determinó el número de UFC/ml para seguir la cinética de muerte. Se graficó la progresión del logaritmo decimal del número de bacterias viables en el curso del tiempo

(comportamiento aproximadamente lineal). El valor del tiempo de reducción decimal de células viables (D) - tiempo en el que el número de células viables se reduce en un factor 10 - fue calculado como el módulo de la inversa de la pendiente de cada una de las rectas que resultan de graficar log UFC/ml vs. tiempo pos-*shock* ácido. La diferencia en la velocidad de muerte se evaluó comparando el valor absoluto de las pendiente de las rectas (1/D).

2.1.5. Ensayos de tolerancia a metales de transición

Para realizar los ensayos de tolerancia a metales de transición se disolvieron las sales de los metales en agua destilada y se las esterilizaron en autoclave. Posteriormente, a partir de esas soluciones *stock* se prepararon los medios de cultivo a utilizar ajustando la concentración requerida. Las placas de TY sólido fueron preparadas en el momento, agregando solución *stock* al medio de cultivo templado.

2.2. Bases de datos y herramientas bioinformáticas utilizadas

A lo largo de este trabajo, utilizamos bases de datos en servidores *on line* de libre acceso que nos brindaron información de genomas secuenciados, proteínas, y rutas metabólicas predichas. Así mismo, en el Capítulo 3 utilizamos herramientas bioinformáticas para la predicción y clasificación de sistemas de dos componentes presentes en *E. meliloti* 2011, y en el Capítulo 4 para avanzar en la caracterización del posible TCS SMC02366/SMC02367 en el mismo rizobio. En todos los casos se emplearon los parámetros establecidos por defecto, a no ser que se indique lo contrario. A continuación, la Tabla 2.1, muestra un resumen de todos los algoritmos de búsqueda, bancos de datos y herramientas empleadas.

Tabla 2. 1. Bases de datos *on line* y herramientas bioinformáticas utilizadas en esta tesis

Base de datos	Utilización	Dirección <i>on line</i>	Referencia en este trabajo
Gen DB	Información genomas secuenciados de rizobios.	http://www.cebitec.uni-bielefeld.de/CeBiTec/rhizogate/	Capítulos 3-4 y en discusiones de todos los capítulos.
Pfam	Información de familias de proteínas.	http://pfam.xfam.org/	Capítulo 3
UniProt	Información de proteínas.	http://www.uniprot.org/	Capítulo 5
SMART	Información de familias de proteínas.	http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1#	Capítulos 3-4
EggNOG	Búsqueda de proteínas ortólogas.	http://eggnogdb.embl.de/#/app/home	Capítulo 5
KEEG	Información de genes, proteínas, metabolitos y vías metabólicas.	http://www.genome.jp/kegg/	Capítulos 3-6
Operome DB	Información de operones bacterianos	http://sysbio.informatics.iupui.edu/operomeDB/#/	Capítulo 4
Herramienta bioinformática	Utilización	Dirección <i>on line</i>	Referencia en este trabajo
BLASTP	Búsqueda de proteínas homólogas y dominios conservados.	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Capítulos 3-4
TMHMM server	Identificación de dominios α -hélices transmembrana.	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/	Capítulos 3-4
MUSCLE	Alineamiento de proteínas.	https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/	Capítulo 4
SyntTax	Exploración del grado de conservación de un entorno génico (sintenia).	http://archaea.u-psud.fr/SyntTax/	Capítulo 4
Phyre2	Búsqueda de proteínas homólogas por modelado de estructuras terciarias.	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index	Capítulo 4
RaptorX	Búsqueda de proteínas homólogas por modelado de estructuras terciarias.	http://raptorx.uchicago.edu/	Capítulo 4
SwissModel	Búsqueda de proteínas homólogas por modelado de estructuras terciarias.	https://swissmodel.expasy.org/	Capítulo 4

2.3. Construcción de mutantes por recombinación homóloga simple

Los mutantes insercionales se generaron por la introducción del plásmido pK19mobΩHMB (Bahlawane *et al.* 2008) conteniendo una región interna del gen a mutar en la cepa de *E. meliloti* 2011 salvaje. Dicha movilización se realizó utilizando la técnica biparental (Simon *et al.* 1983). La cepa donora *E. coli* S17-1 AB pertenece a la biblioteca de la Dr. Becker (anotado como S17-1.PI.G1PELR05D12 en la base de datos genDB). Se seleccionaron aquellos transconjugantes con la capacidad de crecer en placas TY suplementadas con estreptomicina 400 µg/ml y neomicina 120 µg/ml. Se verificó la correcta inserción del plásmido por PCR utilizando *primers* que hibriden en el plásmido y por fuera de la región interrumpida. Los pares de *primers* utilizados se muestran en la Tabla 2.4.

2.3.1. Cepas bacterianas, plásmidos y *primers* utilizados

En esta Sección, mostramos las cepas bacterianas y plásmidos empleados (Tabla 2.1 y Tabla 2.2) como así también los *primers* utilizados para las técnicas de biología molecular (Tabla 2.3). Cabe destacar que características adicionales de las cepas utilizadas para la búsqueda de TCS de *E. meliloti* 2011 asociados a estrés ácido, y en la caracterización funcional del TCS SMc02366/SMc02367, están detalladas en el Capítulo 4. La conservación a largo plazo de las cepas bacterianas se realizó por congelación rápida de cultivos crecidos en medio TY agarizado. La biomasa celular se resuspendió en TY líquido suplementados con glicerol estéril a concentraciones finales del 20% (v/v) o 50% (v/v), según un almacenamiento destinado a -20 °C o a -80 °C respectivamente.

Tabla 2. 2. Cepas de colección y plásmidos utilizados en este trabajo

Cepa	Descripción	Origen
<i>E. coli</i> Top10	<i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> DH5α	<i>recA, vlacU169, F80dlac ZDM15</i>	Bethesda Res. Lab.
<i>E. coli</i> S17-1	<i>E. coli 294 RP4-2-Tc: :Mu-Km: :Tn7</i>	Simon 1983
<i>E. coli</i> S17-1 AB	<i>E. coli</i> S17-1 anotado como S17-1.PI.G1PELR05D12 en la base de datos genDB	Lab. Dra. Anke Becker
<i>E. meliloti</i> 2011 wt	<i>E. meliloti</i> derivado de SV47	J. Denarié
<i>E. meliloti</i> 2011 GFP ⁺	Cepa Eme wt conteniendo la proteína GFP bajo el control del promotor pnpt II en región <i>recA -alaS</i>	Pistorio <i>et al.</i> 2002
Plásmido	Descripción	Origen
pK18 <i>mobsacB</i>	Plásmido suicida en <i>E. meliloti</i> que contiene el gen que codifica para una levansacarasa	(Sukdeo y Charles 2003)
pSRKGm	Plásmido para complementación derivado del pBBR-MCS5 (inducido por IPTG).	(Khan <i>et al.</i> 2008)
pK19mobΩHMB	Plásmido que no replica en <i>E. meliloti</i> 2011	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2008)
pGEM-T	Plásmido linearizado que posee dos timinas protuyentes	EMBIOTEC

Tabla 2. 3. Lista de mutantes utilizada para la búsqueda de RRs implicados en la tolerancia a estrés.

Locus tag/gen	Descripción	Referencia
SMc00158	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMc01043/ <i>ntrC</i>	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	Este trabajo.
SMc01504/ <i>rsiB1</i>	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMc01593	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMc02248	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	Este trabajo.
SMc02366	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	Este trabajo.
SMc04044/ <i>cpdR1</i>	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	Este trabajo.
SMc03006/ <i>cheY1</i>	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMc03046/ <i>ftcR</i>	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMc04011/ <i>tacA</i>	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMc04170	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	Este trabajo.
SMA0206	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	Este trabajo.
SMA0940	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMA0941	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)

Tabla 2.3. Continuación.

<i>Locus tag/gen</i>	Descripción	Referencia
SMA0961/ <i>rctC</i>	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMA0969	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMA1138	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMA1227/ <i>fixJ</i>	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	Este trabajo.
SMA1550	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMA1561	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMA1686	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMA2301	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	Este trabajo.
SMA2325/ <i>kpdE</i>	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	Este trabajo.
SMA2327	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	Este trabajo.
SMB20078	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMB20162	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	Este trabajo.
SMB20219	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMB20468	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	Este trabajo.
SMB20610	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMB20613/ <i>dctD</i>	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMB20702	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMB20869	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMB20934/ <i>exsF</i>	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMB21080	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	Este trabajo.
SMB21115	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	Este trabajo.
SMB21210	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMB21520	Cepa derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)

Tabla 2. 4. Lista de *primers* utilizados en este trabajo.

Región de hibridación	Dirección	Secuencia	Utilización	Referencia en este trabajo
pK19mobOmHmV V	Reverso	ACTGATCCGTCGACCAAAGC		
SMc00653	Directo	TGATTGCTGACGGATCGGATG		
SMc01043	Directo	GATCTGCCGGTTCTCGTGATG		
SMc02248	Directo	CCGATCTGATGCTGCTCGATC		
SMc02366	Directo	ATGGTCACCCGCATGAAGATTC		
SMc03820	Directo	ACAGCTCTCCCTTTACGAAGAG		
SMc04044	Directo	CCGAAGACGACAACGACATGC		
SMc04170	Directo	TTGCTGTCGATATGCTGGCAG	Verificación de mutantes generados por RHS	Capítulo 4
SMA0206	Directo	ATGAAGGTTCTGATCGTCGAGG		
SMA1227	Directo	AAGAGCCGGTCAGGAAGTC		
SMA2301	Directo	CTTCAGGAAAGTGCAGTTGCTG		
SMA2327	Directo	CAAGACCTTTGCGATGCTGAC		
SMA2325	Directo	ATGACCGCAGAGCGTATCCT		
SMb20162	Directo	ACAGCCTTGCCCGTTCATTC		
SMb20468	Directo	GTGAGTGTGCGTATCCTCGT		
SMb21080	Directo	ATGTTGTGGTGGGGGTGTAC		
SMb21115	Directo	GTGATCCATGAGGTTACGG		
SMc02365-SMc02366	Directo	AGATCGAAGCACAGGAAG	Amplificar region SMc02365-SMc02366 sobre cDNA	Capítulo 4
	Reverso	CCTCGAGATCGTCTTCAAC		
SMc02366-SMc02367	Directo	TGTGATCGACGTGCATG	Amplificar region SMc02366-SMc02367 sobre cDNA	
	Reverso	ACAGGACCAGATAGAGCG		
SMc02367-SMc02368	Directo	TCATGGAGATGCACCGC	Amplificar region SMc02367-SMc02368 sobre cDNA	
	Reverso	TCGCCACCACATCGATATC		
Plásmidos suicidas y de expresión	Directo	GTTTTCCCAGTCACG	Verificación de clonados de rutina (<i>primers</i> M13 universales)	Capítulo 2 (Sección2.6)
	Reverso	CAGGAAACAGCTATG		

Tabla 2.4. Continuación

Región de hibridación	Dirección	Secuencia	Utilización	Referencia en este trabajo
SMc02366	Directo (PCR1)	AAAGAATCCCCGCATGAAGATTCTGATTG	Generar Eme Δ RR por la técnica Sukdeo y Charles (2003)	Capítulos 4-7
	Reverso (PCR1)	GCCGTCGCAGGATCCGAGGCAGACAAGCACGT CATAGGC		
SMc02366	Directo (PCR2)	TGCCTCGGATCCTGCGACGGCGTGGTGACGAGAACCATGTTG		
	Reverso (PCR2)	AAAAAGCTTCCGGTCGTCCTTGATCATG		
PCR1 y PCR2	Directo (PCR3)	Directo (PCR1)		
	Reverso (PCR3)	Reverso (PCR2)		
SMc02367	Directo (PCR4)	GCAGTCGATGGATCCGAGGCAGTAGCGGAACGGCTCCGAC	Generar Eme Δ HK ¹ por la técnica Sukdeo y Charles (2003)	Capítulos 4-7
	Reverso (PCR4)	TGCCTCGGATCCATCGACTGCGCGATCTCCGGCAACCGC		
SMc02367	Directo (PCR5)	TGCCTCGGATCCATCGACTGCGCGATCTCCGGCAACCGC		
	Reverso (PCR5)	AAAAAGCTTAACCATGCGAACAGCCAGG		
PCR4 y PCR5	Directo (PCR6)	Directo (PCR4)		
	Reverso (PCR6)	Reverso (PCR5)		
SMc02367	Directo (PCR7)	Directo (PCR4)	Generar Eme Δ HK ² por la técnica Sukdeo y Charles (2003)	Capítulos 4-7
	Reverso (PCR7)	GCAGTCGATGGATCCGAGGCAGATGCCGAGCGCGACCAT		
SMc02367	Directo (PCR8)	Directo (PCR5)		
	Reverso (PCR8)	Reverso (PCR5)		
PCR7 y PCR8	Directo (PCR9)	Directo (PCR7)		
	Reverso (PCR9)	Reverso (PCR8)		
SMc02368	Directo (PCR10)	AAAGAATTCGGAAGCGATCGAGCGGTC	Generar Eme Δ glnE por la técnica Sukdeo y Charles (2003)	Capítulo 4
	Reverso	GCCGTCGATGGATCCCAGGCACGACAGGTCCGCAAGCG		
SMc02368	Directo (PCR11)	TGCCTGGGATCCATCGACGGCAAGCGCGACATCGCGAAGATC		
	Reverso	AAAAAGCTTGAAGATCCGGCGCACGG		
PCR10 y PCR11	Directo (PCR12)	Directo (PCR10)		
	Reverso	Reverso (PCR11)		
SMc02366	Directo	TTTTAAGCTTTGAAGGAGGAACGGGACTATGGTCACCCGCATGAAG	Complementacion Eme Δ RR	Capítulo 4
	Reverso	TTTTGGATCCTCATGCGTCCGTGGTCCG		
SMc02367	Directo	TTTTAAGCTTTGAAGGAGGAACGGACGCATGAGCAGGATC	Complementacion Eme Δ HK1	Capítulo 4
	Reverso	TTTTGGATCCTCAGGTCGCAACCGCCGGG		

2.4. Transferencia de ADN foráneo

La incorporación de moléculas de ADN foráneo en células de *E. coli* se realizó por electrotransformación (electroporación). La transferencia de ADN entre *E. coli* y *E. meliloti* se realizó por conjugación biparental.

2.4.1. Transformación por electroporación

La preparación de células de electrocompetentes se llevó a cabo por la técnica de Tung y Chow (Tung y Chow 1995). Se inocularon 100 ml de medio LB con 1 ml de un cultivo saturado durante 24 horas a 37 °C y con vigorosa agitación. Cuando la DO₆₀₀ del cultivo llegó a un valor cercano a 0,6 el cultivo se enfrió en hielo durante 15 min. De aquí en adelante todo el procedimiento se realizó en frío. Las células se centrifugaron a 4.000xg por 15 min a 4 °C y se lavaron 2 veces con 200 ml de glicerol 10%. Finalmente, las células se resuspendieron suavemente en 0,5 ml de 10% glicerol en agua bidestilada y se fraccionaron en alícuotas de a 100 µl.

La electrotransformación fue llevada a cabo usando un equipo Gene Pulser (BioRad) en cubetas de 0,1 ml en condiciones de 25 µF, 200Ω, 2,5 kV para cepas de *E. coli* o de 25 µF, 200Ω, 21 kV para cepas de *E. meliloti*. Luego de la electrotransformación se adicionó inmediatamente 1 ml de medio rico y se incubó por 1 hora a la temperatura óptima de crecimiento de la cepa en cuestión para permitir la expresión de fenotipos de resistencia a antibióticos que se hayan incorporado en la transformación. Finalmente las células se plaquearon en medio rico selectivo y se incubaron 24-48 hs.

2.4.2. Conjugación

Las conjugaciones fueron realizadas según Simon *et al.* (Simon, 1983). A partir de 0,7 ml de un cultivo de la cepa donadora (en general cepas de *E. coli* S17-1 portadoras del plásmido a transferir) con una DO₆₀₀ = 0,4 - 0,5, se le agregaron 0,7 ml de un cultivo de igual densidad óptica de la cepa aceptora (en nuestro caso *E. meliloti* salvaje o mutantes). La mezcla se centrifugó a 2400 rpm por 8 minutos y el pellet se resuspendió suavemente en aproximadamente 50 µl de medio TY líquido. Una gota de la suspensión bacteriana se colocó en una caja con medio TY sólido. La incubación se realizó a 28 °C durante toda la noche. La totalidad del crecimiento bacteriano fue resuspendido en medio TY líquido y plaqueado en

medio TY suplementado con los antibióticos adecuados. En todos los casos se incluyeron controles con la cepa donadora y la cepa receptora procesadas por separado.

2.5. Construcción de mutantes delecionales

Para construir mutantes delecionales sin la modificación del marco de lectura de genes contiguos y sin la incorporación de genes de resistencia a antibióticos, se llevó a cabo la estrategia de *crossing* PCR descrita por Horton y colaboradores (Horton *et al.* 1989) y posteriormente utilizada por Sukdeo y colaboradores para *E. meliloti* (Sukdeo y Charles 2003). Esta metodología, que describe a continuación y que se esquematiza en la Figura 1.1, fue la utilizada para generar los mutantes Eme Δ RR, Eme Δ HK¹, Eme Δ HK¹, Eme Δ RR Δ HK Eme Δ glnE.

La técnica consiste en la inserción de un plásmido por recombinación homóloga simple (RHS) en un región interna del gen a mutar y posteriormente lograra una resolución del co-integrado de tal manera que genere una deleción interna del gen en cuestión.

Para llevar a cabo esta estrategia, es necesario generar un oligómero sintético (segmento a clonar, Figura 1.1) que contenga las regiones inicial y final del gen a mutar (regiones 1 y 2 en la Figura 1.1) utilizando tres PCRs: 2 que amplifiquen las regiones de los extremos (PCR1 y PCR2, Figura 1.1) y una tercera que, por complementación de bases de los productos de las PCRs anteriores, genere el oligómero sintético (PCR3, Figura 1.1).

Para realizar estas PCR los *primers* B y C (Figura 2.1) se diseñan de modo tal que los extremos 5' posean 21 pares de bases de extras complementarios entre sí. Los *primers* A y D fueron sintetizados con el agregado de sitios de corte de enzimas de restricción en sus extremos 5'.

El segmento así construido se clonó en el vector pK18*mobsacB* (Schafer *et al.* 1994) y se introdujo en una cepa de *E. coli* S-17 por electrotransformación, y en una cepa de *E. meliloti* por conjugación biparental. La integración por RHS del vector en el gen a mutar se confirmó por *colony* PCR realizada en aquellas bacterias que crecieron en medio rico TY con neomicina (marcador de selección positiva que contiene pK18*mobsacB*).

La formación del co-integrado resulta en la expresión del gen *sacB*, que codifica para la enzima levansacarasa encargada de sintetizar polímeros de fructosa tóxicos para muchas bacterias (Pelacic *et al.* 1996), incluida *E. meliloti*. Como estos polímeros son sintetizados a

partir de sacarosa como sustrato, el agregado de este disacárido a un cultivo bacteriano que esté expresando la levansacarasa, resulta en lisis celular. En nuestro caso, se utilizó sacarosa al 15% en medio TY.

Cierta proporción de los mutantes RHS pueden evadir la presión de selección impuesta resolviendo el cointegrado y restaurando la capacidad de crecer en sacarosa. En la mayoría de los casos, el cultivo que creció en un medio TY conteniendo sacarosa, estará enriquecido en células mutantes que han delecionado la región interna del gen a mutar (mutantes delecionales, o “limpios”).

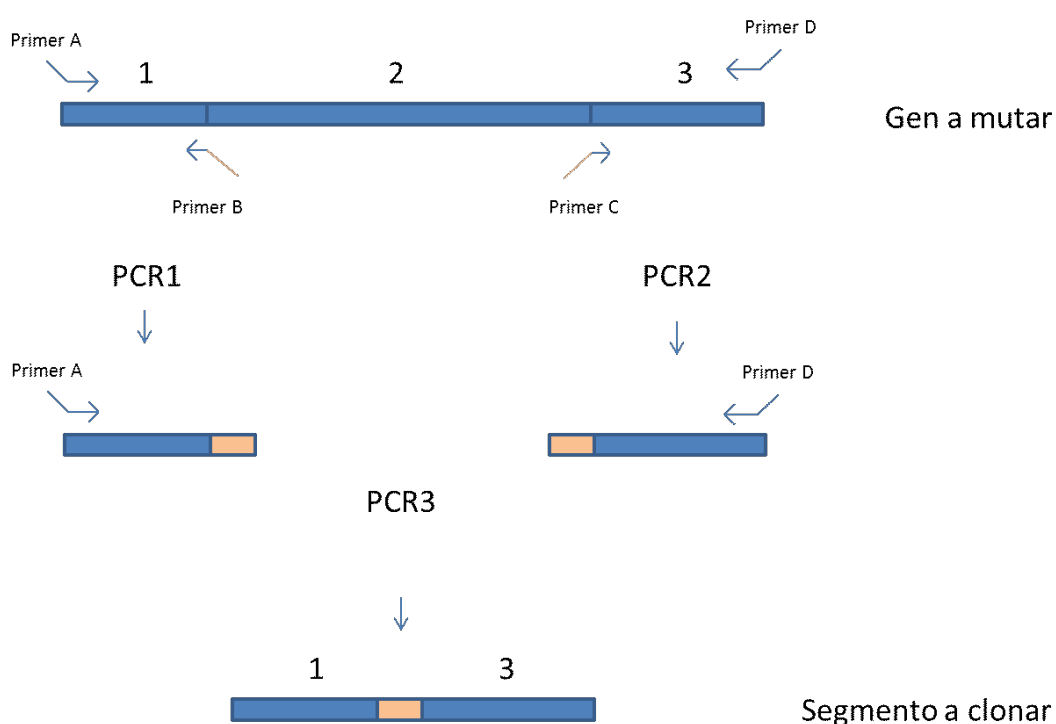


Figura 2. 1. Esquema ilustrativo de la técnica de *crossover PCR*.

Con esta estrategia se genera un segmento que posee las secuencias inicial y final de un gen a partir de la PCR3 usando las PCR1 y PCR2 como molde. En rosa se indica el fragmento extra de 21 nucleótidos agregado para dicha unión.

2.6. Restauración de la mutación por complementación

Las mutaciones delecionales de los genes que componen el TCS SMC02366/SMC02367 fueron restauradas por la introducción del vector pSRKGm (Khan *et al.* 2008) conteniendo los genes intactos clonados. Alternativamente, los ensayos para evaluar la restauración del fenotipo fueron realizados con y sin el agregado de IPTG como inductor (100 μ M). Cuando se

cultivaron cepas de *E. meliloti* que contenía este plásmido en medio mínimo GS, la concentración utilizada de gentamicina fue de 10 µg/ml.

2.7. Construcciones genéticas y manipulación de ADN

Las metodologías generales de ingeniería genética se realizaron según Sambrook et al. (Sambrook *et al.* 1989).

2.7.1. Preparaciones de ADN plasmídico

Las preparaciones de ADN plasmídico se realizaron por el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.* 1989) a mini escala (miniprep) y el ADN fue purificado utilizando un protocolo basado en unión a sílica (SiO₂) (Rappleye 2004). En la lisis alcalina, luego de la precipitación con acetato de potasio 3M pH=5,4, se recoge el sobrenadante y a este se le agrega la cantidad apropiada de sílica (capacidad de unión de aprox. 200 ng de ADN/µl de suspensión). Se centrifuga 10 segundos a máxima velocidad y se lava tres veces con 500 µl solución de lavado (50 mM NaCl, 10 mM Tris 7,5, 2,5 mM EDTA, 50% etanol). Se centrifuga a máxima velocidad y se seca el precipitado al aire. Para la elución se agrega el volumen deseado de agua de calidad adecuada y se incuba 5 minutos a 60 °C. Se centrifuga y se guarda el sobrenadante.

Alternativamente, se utilizó el *kit* comercial AccuPrep Plasmid MiniPrep DNA Extraction (BIONEER).

2.7.2. Purificación de bandas de gel de agarosa

La recuperación de ADN a partir de bandas de gel de agarosa se realizó utilizando el método basado en unión a sílica, con las siguientes modificaciones. La banda a recuperar se cortó con un bisturí y se colocó en un tubo tipo Eppendorf de 1,5 ml. Para disolver la agarosa, se agregó NaI 6M en una proporción de 3 veces el peso del gel (Aproximando la densidad de la solución NaI 6M como 1 g/ml). Luego se incubó a 65 °C hasta disolución completa de la agarosa y se agregó 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3M pH=5. *A posteriori*, se agregó el volumen apropiado de suspensión de sílica (capacidad de unión de 200 ng de ADN/µl de suspensión, aproximadamente). Se centrifugó 10 segundos a máxima velocidad y se lavó tres veces con 500 µl solución de lavado. Luego, se centrifugó a máxima velocidad y se secó el

precipitado al aire. Para la elución se agrega el volumen deseado de agua de calidad para biología molecular. Se incubó 5 minutos a 60 °C. Se centrifugó y se guardó el sobrenadante.

Alternativamente, se utilizó el *kit* comercial AccuPrep Gel Purification (BIONEER)

2.7.3. Determinación de concentraciones de ADN

Para determinar la concentración y calidad de las preparaciones de ADN se midió la absorbancia a 260 y 280 nm. Para ello se utilizó un espectrofotómetro Nanodrop ND1000 (Nanodrop Technologies) según las especificaciones del fabricante.

2.7.4. Electroforesis en geles de agarosa

La verificación de las preparaciones de ADN y la separación de fragmentos de restricción se llevó a cabo mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa de concentración entre 0,8% y 1,5% en tampón TBE (Tris 89 mM, EDTA Na₂ 2,5 mM, H₃BO₃ 89 mM, pH 8,2). Para la visualización del ADN, los geles de agarosa se prepararon con bromuro de etidio (0,5 µg/ml). El voltaje de trabajo se varió entre 5 y 12 volts/cm según los tamaños a separar. Como solución de carga se utilizó sacarosa 40% y azul de bromofenol 0,25% en una relación 5 µl solución de ADN/1 µl solución de carga.

La presencia de bandas de ADN se observó con luz UV de 260 nm en un transiluminador. El registro de los geles se realizó por fotografía con una cámara digital. El tamaño de los fragmentos de restricción se determinó por interpolación gráfica en curvas de calibración en las que se representó el logaritmo del peso molecular de los fragmentos de ADN frente a la movilidad relativa de los mismos. Como patrón se empleó ADN del fago lambda digerido con la endonucleasa de restricción *Hind*III y marcadores de peso molecular comerciales.

2.7.5. Tratamientos enzimáticos del ADN

Las digestiones con enzimas de restricción, se realizaron en las condiciones óptimas para las enzimas, siguiendo las indicaciones de temperatura y tampón indicadas por los proveedores comerciales (Fermentas, PROMEGA, Invitrogen), y las recomendaciones descritas por Sambrook y colaboradores (Sambrook *et al.* 1989).

2.8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y síntesis de ADN complementario (ADNc)

2.8.1. PCR y oligonucleótidos utilizados

Los ensayos de PCR fueron realizados en ciclador Bioer Thermal Cycler o similar. La composición final de las mezclas fue: 1x buffer Tris-HCl; 200 μ M dNTPS; 0,5 μ M de cada cebador y 1 U de Taq polimerasa (Embiotec, Argentina). El contenido $MgCl_2$ se lo ajustó para cada reacción en particular.

2.8.2. Extracción de ARN

La obtención de ARN total bacteriano fue realizada utilizando una extracción de fenol/isotiocianato de guanidinio comercial (Trizol, Promega) y cloroformo como indica el fabricante. La precipitación del ARN extraído se precipitó con isopropanol y se midió la concentración del mismo por absorbancia (Nanodrop Technologies). Luego, la muestra fue tratada con una nucleasa específica de ADN para eliminar ese contaminante (DNAsa I, promega). El tratamiento se efectuó por 30 min a 37 °C y la cantidad de enzima utilizada fue 1 U/ μ g de ARN. La nucleasa de ADN fue inactivada a 65°C luego del agregado de ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) en una concentración de 50 mM.

2.8.3. Síntesis de ADN complementario

Para la síntesis de ADN complementario se utilizó la retrotranscriptasa comercial M-MLV (Embiotec, Argentina) y se siguió el protocolo de uso del fabricante. Se partió de 1 μ g de ARN total y se utilizó *random primers* (cebadores al azar) para lograr la síntesis de la hebra complementaria. En primer lugar se preincubó el ARN, los *primers* y los dNTPs (Embiotec, Argentina) 5 min a 65 C. Luego se agregó la enzima y se sintetizó la hebra complementaria 1h a 42°C.

2.9. Visualización de lipopolisacáridos de membrana

2.9.1. Extracción de lipopolisacáridos de membrana

Para la extracción de lipopolisacáridos (LPS) de membrana de *E. meliloti*, en primera instancia se resuspendió aproximadamente una masa celular correspondiente a media placa de Petri de un cultivo previo de 48 hs del rizobio en 100 μ l de *buffer* EDTA-trietilamina

(NaEDTA 100mM, pH=7,0 preparado en etrietilamina). A esa suspensión densa, se la incubó con agitación por 25-30 minutos a temperatura ambiente y se la centrifugó a 10 min a 7.000xg. Se recuperó el sobrenadante, se le adicionó resina Affi-prepPolimyxinsupport (BioRad) y se lo incubó por al menos 30 minutos con agitación suave. Luego, se dejó decantar la resina que contiene LPS y se descartó el sobrenadante. Por último la resina se lavó dos veces con 200µl de *buffer* fosfato LPS (KH₂PO₄ 100mM, NaCl 150 mM) realizando ciclos de agitación manual centrifugación a 6.000xg por 3min. Los LPS adsorbidos a la resina se guardaron a -20°C hasta su utilización.

2.9.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Para visualizar los LPS, se realizaron corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida preparados igual que la indicada para geles de proteínas (Sección 2.10.3). La muestra se descongeló y se la resuspendió en 80 µl de *buffer* Laemmli 1X (Sección 2.10.3). Posteriormente, se la hirvió por 5 minutos y se la sonicó en sonicador de baño por 15 minutos. Luego se la centrifugó a 8000 xg por 5 minutos y se sembró en un gel 20 µl de la muestra para realizar la corrida electroforética (130 Volts por 1 hs).

El revelado se llevó a cabo luego de incubar los geles toda la noche con solución fijadora de LPS (etanol 40%, ácido acético 5% en agua bidestilada) y lavándolos dos veces con agua bidestilada. En primera instancia se trataron los geles con ácido periódico 0,7% por 10 minutos y se retiró el reactivo lavándolos con agua bidestilada 5 veces por 5 minutos cada vez. Posteriormente, se retiró el agua y se les adicionó solución de plata (BioRad) al 10% preparada en el momento con agua bidestilada. Se incubó los geles por 20 minutos. Se retiró el reactivo y se lavaron los geles con agua bidestilada 5 veces por 5 minutos cada vez. Por último, se incubaron los geles con el desarrollador (BioRad) preparado en el momento en una concentración 1,5% p/v hasta aparición de las bandas de color marrón. Se descartó el desarrollador, se lavaron los geles con agua bidestilada y detuvo la reacción con solución ácido acético al 5%.

Todo el procedimiento se realizó con guantes y con agua bidestilada.

2.10. Técnicas utilizadas para los análisis proteómicos

2.10.1. Extracción de proteínas totales

Para comenzar, se centrifugaron 250 ml de cultivos que poseían un DO_{600} = 0,5 a 10.000xg por 30 min a 4°C, y se realizaron dos ciclos de resuspensión y centrifugación en 30 ml de solución buffer LS (*Low Salt*: KCl, 3 mM; NaH_2PO_4 , 9 mM; KH_2PO_4 , 1,5 mM; NaCl, 68 mM). Los *pellets* secos así obtenidos se resuspendieron en 6,5 ml de *buffer* TRIS pH=7,6 y se les agregó 6,5 µl del inhibidor de proteasas PMSF (0,25M). Se procedió a la ruptura de las células colocando las muestras en viales conteniendo 500 mg de esferas de vidrio (1 mm) y aplicando 4 pulsos por 20 seg a velocidad 5500 en un homogenizador de alta potencia (Precellys, Bertin). Posteriormente, se separaron las esferas y los restos celulares centrifugando los tubos a 10.000xg por 20 min a 4°C y se recuperaron los sobrenadantes. Se procedió a la degradación de ácidos nucleicos adicionando 1 µl de DNAsa y 4 µl de RNAsa (10 mg/ml) por cada 5 ml de muestra e incubándolas 1 hs a 37°C. Las muestras se conservaron a 4°C.

2.10.2. Fraccionamiento subcelular para separar proteínas citosólicas y de membrana

Para separar las proteínas solubles de aquellas asociadas a membranas, realizamos una ultracentrifugación a 100.000xg por 2hs a 4°C (ultracentrífuga Beckman Coulter, rotor basculante SW 41 Ti). Las proteínas citosólicas (sobrenadante) se precipitaron a 10.000xg 30 min a 4°C previa incubación por 24 hs con 4 volúmenes de acetona fría. Estas proteínas y las proteínas de membrana (precipitados de la ultracentrifugación) se resuspendieron en un *buffer* de rehidratación (urea, 7M; tiourea, 2M; isopropanol, 10%; Tritón X100, 2%). Los preparados se conservaron a -80%.

2.10.3. Análisis de proteínas mediante geles de poliacrilamida discontinuos en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Para evaluar la calidad de las proteínas, se realizaron ensayos electroforesis de geles de poliacrilamida 13% en condiciones desnaturalizantes (13% SDS-PAGE). Los geles de apilamiento se prepararon con 5% de poliacrilamida en Tris -HCl a pH= 6,8, mientras que los de separación se hicieron con 12,5% de poliacrilamida en Tris-HCl a pH= 8,8. En las calles del gel se sembraron 20 µl de muestra previamente preparadas en buffer Laemmli 4X (278 mM

Tris-HCl pH=6,8; glicerol 40% v/v; SDS 4,4%; azul bromofenol 0,02%). Las corridas se llevaron a cabo durante 30 a 60 minutos en equipos Miniprotean II (BioRad) a 100 - 120 volts. Las proteínas en el gel fueron visualizadas por tinción con Azul Coomassie (metanol 50% v/v, ácido acético 5% v/v, Coomassie Brilliant Blue R2500, 1% p/v). Los geles se incubaron con la solución colorante a temperatura ambiente durante 12 horas aproximadamente. Luego fueron desteñidos mediante una serie de lavados sucesivos con solución decolorante (metanol 50% v/v, ácido acético 5% v/v). El registro digital se realizó sobre un transiluminador con luz blanca.

2.10.4. Cuantificación, reducción, alquilación y precipitación de las proteínas

Para la identificación de proteínas por LC/MS-MS es necesario reducir las proteínas y alquilarlas.

En una primera etapa se cuantificaron las proteínas por la técnica de Bradford (Bradford, 1976). Para esta técnica, se empleó un reactivo comercial (Bio- Rad Protein Assay), siguiendo el protocolo del fabricante para la técnica medida en microplaca y utilizando como estándar seroalbúmina bovina (BSA), de concentración 10mg/ml, para confeccionar la curva de calibración. Las medidas de absorbancia a 595 nm se realizaron en un lector de microplaca.

Posteriormente, se diluyeron las muestras en *buffer* TRIS para continuar el protocolo utilizando aproximadamente 50 µg de proteínas totales. La reducción se realizó incubando las muestras con DTT (ditiotreitrol) 45min a 56°C en una concentración final del mismo de 10 mM. La alquilación se realizó con iodoacetamida en una concentración final de 20 mM, e incubando la muestra 45 min a temperatura ambiente. Por último, las proteínas se precipitaron con el agregado de 0,2 volúmenes de TCA (ácido tricloroacético), posterior incubación a -20°C por dos horas, y centrifugación a máxima velocidad por 10 min. El *pellet* se lavó tres veces con acetona fría para remover el TCA realizando pasos de resuspensión y centrifugación cada vez. Se retiró la acetona remanente por evaporación a temperatura ambiente. Las proteínas así obtenidas se pueden guardar a -80°C.

2.10.5. Identificación de proteínas por LC/MS-MS

Las proteínas se resuspendieron en bicarbonato de amonio 50 mM pH=8 y se realizó una digestión de las mismas con tripsina (Promega V5111). Luego de purificarlos y desalarlos con columnas ZipTip C18 (Milipore), los péptidos se analizaron en un espectrómetro QExactive

(Thermo Scientific) acoplado a un nanoHPLC EASY-nLC 1000 (Thermo Scientific). En cada corrida se inyectaron 2 μ l de muestra (aproximadamente 1 μ g de péptidos) y se utilizó una columna en fase reversa para la elución de los mismos (C18, 2 μ m, 100Å, 50 μ m x 150 mm) Easy-Spray Column PepMap RSLC (P/N ES 801). Se utilizó un flujo de 3×10^{-4} ml x min⁻¹ y la polaridad del solvente varió de 7% (5 min) a 35% del solvente B (120min). El solvente A consistió en ácido fórmico 0,1% en agua y el B en ácido fórmico 0,1% en acetonitrilo.

El espectrómetro Q-Exactive contiene una fuente de ionización por *electrospray* una celda de colisión HCD, y un analizador orbitrap. Se utilizaron 3,5 kilovolts para ionizar los péptidos y se realizó un escaneo en el rango 400-1800 masa/carga a una resolución de 70.000 a 400 masa/carga. En cada ciclo, se identificaron en el analizador 12 iones más intensos, previa fragmentación en la celda de colisión.

2.10.6. Análisis de los datos

La información obtenida del espectrómetro Q-Exactive se procesó utilizando el programa Proteome Discoverer 2.1.1.21 (Thermo Scientific) y se asociaron los *hits* con la base de datos UniProt (<http://www.uniprot.org/>).

2.11. Técnicas utilizadas para los análisis metabolómicos

2.11.1. Obtención y tratamiento de las células

Las células se obtuvieron centrifugando 200 ml en tubos Falcon de 50 ml a 10.000 xg por 2 min, retirando el sobrenadante y congelándolas rápidamente en nitrógeno líquido para detener el metabolismo. Posteriormente, las células se liofilizaron por 6 hs (liofilizador Telstar Lyoquest).

2.11.2. Ruptura de las células y derivatización de los metabolitos

Las células liofilizadas se pesaron en balanza analítica para y se colocó entre 5-8 mg de células liofilizadas en tubos de 1,5 ml de tapa roscada conteniendo 0,5 g de esferas de vidrio de 0,5 mm. Se les agregó 1 ml de metanol (80%) en agua conteniendo 100 μ M de ribitol (estándar interno). La ruptura de las células se realizó con 3 pulsos de 45 seg a 6500 de velocidad en un homogenizador de alta potencia (Precellys, Bertin). Posteriormente se centrifugaron a 16000 xg por 20 min a temperatura ambiente para recuperar el

sobrenadante. Las muestras se evaporaron por corriente de nitrógeno gaseoso usando un Reacti-Therm (Thermo Scientific) a 37°C en viales de vidrio adecuados. La derivatización de los metabolitos se realizó en el mismo equipo y a la misma temperatura, con la adición de 50 µl de metoxilamina (MeOX) disuelta en piridina (20 mg/ml) y 50 µl de MTSFA (N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida). El tiempo de incubación para estas reacciones fue de 90 min y 30 min respectivamente, y la adición de los reactivos fue secuencial.

La derivatización es una técnica utilizada en el campo de la química analítica que consiste en la modificación covalente de los compuestos para que sea factible su identificación por técnicas cromatográficas. (Azizan *et al.* 2012). Las modificaciones covalentes que experimentan los metabolitos, se ejemplifican en la Figura 2.2 con una molécula de glucosa.

Por último, las muestras se recuperaron con pipetas tipo Pasteur de vidrio y se colocaron en viales utilizados por el espectrómetro de masas.

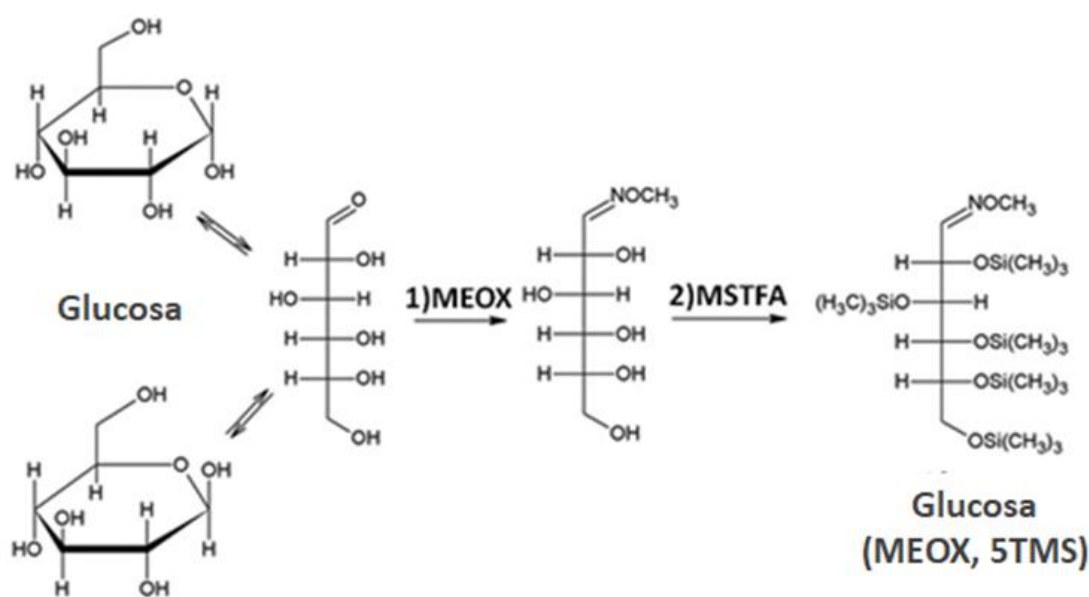


Figura 2. 2. Derivatización con metoxilamina y MSTFA.

Utilizando de la glucosa a modo de ejemplo, el esquema muestra las modificaciones covalentes que experimentan los metabolitos en la derivatización. La derivatización consistió en la reacción de grupos cetos con metoxilamina (MEOX) en primera instancia, y posteriormente en el agregado de grupos trimetilsilil (TMS) en los oxidrilos por N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA). Modificado de Heim *et al.* (2013).

2.11.3. Identificación de los metabolitos por GS/MS-MS

La identificación de los metabolitos se realizó en un cromatógrafo de gases Trace GC acoplado a un espectrómetro de trampa de iones PolarisQ y equipado con un sistema de inyección automática AS2000 (Thermo Scientific). Los metabolitos derivatizados se evaporaron a 250°C en modo *splitless* y fueron separados en una columna capilar RTX-5MS con 0,25 de *coating* equipada de una columna de guarda de 10m (Restek, Alemania). El flujo de gas de helio se ajustó a 1ml/min y las temperaturas de interfase y de la fuente de iones a 250°C y 220°C, respectivamente. La temperatura del horno se mantuvo constante a 80°C por 3 min y luego llegó a 325°C a una velocidad de 5°C/min. Los espectros de masas se registraron en un rango de 50-750 masa/carga. Los metabolitos se identificaron realizando una comparación entre los tiempos de retención y los valores masa/carga de ellos con los registrados previamente en los estándares de referencia (Tabla 2.4). Las áreas de los picos de los metabolitos se obtuvieron por integración automática de los mismos automatizada con el *software* Xcalibur 1.4 (Thermo Scientific). Esos valores se normalizaron por el área del ribitol (estándar interno) y luego por la masa de células de la muestra correspondiente.

Tabla 2. 5 Lista de metabolitos utilizados como estándares de referencia en el análisis GC-MS/MS realizado en células de *E. meliloti* 2011.

Acidos orgánicos	Aminoácidos y derivados	Oligosacáridos y derivados	Compuestos nitrogenados	Polialcoholes
Lactato	Alanina	Glicerol	Urea	Mio-inositol
Piruvato	Valina	Succinato	Etanolamina	Mioinositol-P
β-aminoisobutirato	Leucina	Sacarosa	Uracilo	Pinitol
Malonato	Isoleucina	Celobiosa	N-acetilglucosamina	
Fumarato	Prolina	Maltosa	adenosina	
Glicerato	Norleucina	Trehalosa	Espermidina	
Siquimato	Serina	Melobiosa	Timina	
2-isopropilmalato	Treonina	Xilosa	Citosina	
2-cetoglutarato	S-metilcisteína	Arabinosa		
2-hidroxiglutarato	β-Alanina	Glicerol-3-P		
Fosfoenolpiruvato	Homoserina	Fructosa-6-P		
Gluconato	Glutamina	Glucosa-6-P		
Ácido glucurónico	γ-aminobutirato	Ramnosia		
Ácido pantoténico	L-Aspartato	Ribosa		
2-metilcitrato	Cisteína	Fructosa		
2-cetocaproato	Fenilalanina	Galactosa		
	Homocisteína	Glucosa		
	Glutamato	Manitol		
	Metionina	Eritrosa-4-P		
	Hidroxiprolina	Ribosa-5-P		
	Asparagina	Ribulosa-5-P		
	Histidina	Fructosa-6-P		
	Lisina	Gluconolactona		

Tabla 2.5. Continuación.

Acidos orgánicos	Aminoácidos y derivados	Oligosacáridos y derivados	Compuestos nitrogenados	Polialcoholes
	Adenina	Dihidroxiacetona-P		
	Cistina	Isocitrato		
	Tirosina	Glicerato-2-P		
	Triptofano	Glicerato-3-P		
	Arginina	Citrato		
	L-cistationina	Cis-aconitato		
	1-metil-L-histidina.	Malato		
	2-Aminoadipato			
	Ornitina, citrulina, arginina.			

2.11.4. Análisis estadístico y cuantificación diferencial de metabolitos

Una vez obtenido las intensidades de los metabolitos evaluados mediante el programa Xcalibur y luego de normalizar los valores, procedimos al análisis estadístico global de los datos y a la cuantificación diferencial de los metabolitos. Estos análisis los realizamos en el programa *on line* Metaboanalyst (<http://www.metaboanalyst.ca/faces/home.xhtml>).

2.12. Ensayos en plantas

2.12.1. Esterilización y germinación de semillas

En los distintos experimentos se utilizó *Medicago sativa* (alfalfa) cultivar Super Monarca como planta huésped. Las semillas fueron en primer lugar desgrasadas por inmersión en etanol 96% durante 30 segundos. Transcurrido este tiempo se descartó el etanol y se trató a las semillas con solución 20% (V/V) de lavandina comercial (60 g/l) durante 15 minutos. A continuación las semillas se lavaron 8-10 veces con abundante agua estéril. A continuación, se extendieron en condiciones asépticas sobre placas de Petri con agar agua 1,5% (P/V), y se dejaron finalmente en oscuridad a 22 °C por 30 hs para la germinación. Se realizaron controles del procedimiento de esterilización depositando semillas escogidas al azar sobre placas de TY.

2.12.2. Condiciones de cultivo de las plantas

El crecimiento de las plantas fue realizado en cajas plásticas cuadradas conteniendo solución de Fåhraeus solidificado con agar al 15% en condiciones de esterilidad para la realización de

ensayos tales como: el análisis de la competición por la adhesión a raíz y por la nodulación (Secciones 2.11.3 y 2.11.4), para evaluar la cinética de nodulación (Sección 2.11.5), la obtención de bacterias viables de nódulos (Sección 2.11.8), o en observación de los nódulos por microscopía confocal (Sección 2.15.3). Para la determinación de peso seco en ensayos de nodulación (Sección 2.11.7) los experimentos fueron realizados en vasos plásticos en condiciones asépticas.

Todos los ensayos fueron realizados en una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16/8 hs luz/oscuridad, 25/18 °C de temperatura (día/noche), y 50% de humedad relativa. En el caso del cultivo en vasos plásticos, el riego de las plantas se realizó con intercalando agua estéril y solución de Fåhraeus cada 48hs aproximadamente. La solución Fåhraeus es una solución mineral que utilizamos para el cultivo de las plantas que no posee fuente de carbono ni de nitrógeno. Su composición es la siguiente:

Compuesto	g/l	Solución de micronutrientes (1000x)	g/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,114	KCl	3,73
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,12	H ₂ BO ₃	1,55
Citrato férrico	0,005	SO ₄ Mn·H ₂ O	0,85
KH ₂ PO ₄	0,1	CuSO ₄ ·7H ₂ O	0,13
Na ₂ HPO ₄	0,15	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,58
Solución de micronutrientes	1 ml	(NH ₄)MoO ₄ ·4H ₂ O	0,01

2.12.3. Experimentos de competición por la adhesión a raíz de plantas de alfalfa

Los experimentos de competición por la colonización de nódulos de plantas de alfalfa fueron realizados inoculando plantas en macetas con las cepas a ensayar (en una proporción 1:1, 1x10⁵ UFC/ml) y recuperando los rizobios de la raíz a los 3 dpi. Para realizar esto último, se tomaron las plantas inoculadas, se las introdujo en tubos tipo Falcon conteniendo solución de Fåhraeus estéril y se obtuvieron los rizobios unidos vorteando los tubos por 20 segundos a máxima velocidad.

Cada cepa a ensayada se co-inoculó en relación 1:1 con una cepa fluorescente verde (*E. meliloti* 2011 GFP⁺, Sección 2.6) que no posee diferencias en la adhesión con la cepa Eme wt. Como control interno del ensayo se usó la competición Eme wt/*E. meliloti* GFP⁺ que se sabe que no se excluyen mutuamente en la nodulación (Pistorio *et al.* 2002).

La evaluación del grado de adhesión a raíz se realizó por recuento diferencial de células fluorescentes y no fluorescentes recuperadas de la raíz y plaqueadas en medio TY agarizado. Para identificar rizobios fluorescentes, se utilizó una lupa Leica MZFL III, bajo iluminación con una lámpara de mercurio de 480 nm de longitud de onda. Se graficó la proporción inicial de las cepas al inocular las plantas y la proporción de bacterias obtenidas luego de la extracción de la raíz.

2.12.4. Experimentos de competición por la colonización de nódulos de plantas de alfalfa

Los experimentos de competición por la colonización de nódulos fueron realizados inoculando puntas de raíz con inóculos conteniendo la cepa a ensayar y la cepa *E. meliloti* 2011 GFP⁺ (Sección 2.6) y una cepa a ensayar en relación 1:1 (en el orden de 5×10^5 UFC/raíz). A los 20 dpi se recuperaron los nódulos y se trataron como se indica en la Sección 2.12.3. Los macerados obtenidos se plaquearon en placas TY agarizadas y la búsqueda de rizobios fluorescentes se realizó como se indica en la Sección 2.12.4. Se graficó el porcentaje de ocupación de la cepa a ensayar con respecto a *E. meliloti* 2011 GFP⁺. Como control interno del ensayo se usó la competición *E. meliloti* 2011/*E. meliloti* 2011 GFP⁺ que no se excluyen mutuamente en la nodulación (Pistorio *et al.* 2002).

2.12.5 Análisis de la cinética de nodulación de *E. meliloti* 2011 y sus mutantes

A partir de plantas inoculadas en cajas plásticas (1×10^6 UFC/ml por punta de raíz), se registró la aparición de nódulos a los 10 dpi y a los 20 dpi. Para evaluar la cinética de nodulación, se graficó nódulos/raíz vs tiempo y se estimó la pendientes de las curvas.

2.12.6. Ensayos de nodulación de plantas de alfalfa

Para evaluar la capacidad de algunas cepas de nodular plantas de alfalfa se cultivaron las cepas en medio rico TY, se centrifugaron y resuspendieron en solución Fåhræus (Fåhræus 1957) sin nitrógeno. Se diluyeron los inóculos en solución Fåhræus hasta alcanzar una

concentración de aproximadamente 1×10^7 UFC/ml. Se inocularon las plantas con 5 ml de este preparado. Al momento de la inoculación, las plantas tenían 5 días.

2.12.7. Determinación del peso seco de parte aérea de plantas

A los 30 dpi se cortó la parte aérea de las plantas inoculadas y se las colocó en bolsas de papel para secarlas 72 hs a 70°C. Se evaluó la capacidad de la planta de fijar nitrógeno pesando las plantas en balanza analítica. Para un análisis estadístico adecuado, se utilizaron aproximadamente 30 plantas por condición.

2.12.8. Reaislamiento de los rizobios a partir de nódulos de plantas de alfalfa

Los nódulos fueron separados de la planta y esterilizados en superficie con H₂O₂ 20% durante 10 min. Seguidamente, se los lavó con agua estéril 5-6 veces y se los maceró en 100 µl de agua estéril con varillas de madera estériles en placas multi-pocillos. Se realizaron diluciones seriadas 1/10 con solución fisiológica y se utilizó el método de recuento en gota (Sección 2.1.3) para calcular las UFCs de cada macerado.

2.13. Técnicas de microscopía

2.13.1 Microscopía óptica

Los nódulos provenientes de plantas crecidas durante 30 días se cortaron por la mitad y se fijaron en glutaraldehído al 2% en buffer fosfatos (pH=7,2-7,4) durante 2 horas a 4°C. Posteriormente se deshidrataron en una serie creciente de etanol (25, 50, 75 y 96%) y se incluyeron en resina epoxi. Los cortes semifinos fueron teñidos con azul de toluidina y observados en un fotomicroscopio Nikon E200 por contraste de fase en luz visible. Las imágenes fueron tomadas con una cámara digital (Tucsen TCC 5.0) y editadas por el *software* provisto por el fabricante.

2.13.2 Microscopía electrónica de transmisión (MET)

A los nódulos cortados por la mitad y fijados con glutaraldehído se les realizó una fijación secundaria con tetróxido de osmio 1% p/v durante una hora a 4°C y posteriormente se deshidrataron en una serie creciente de etanol (25, 50, 75 y 96%) y se incluyeron en resina epoxi. Los cortes ultrafinos (70 nm) se realizaron con un ultramicrotomo SuperNova Reichert- J, se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron en un

microscopio electrónico de transmisión JEM 1200 EX II (JEOL), ubicado en el Servicio Central de Microscopía de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.

2.13.3. Microscopía confocal en la determinación de bacteroides vivos/muertos

Nódulos de 30 días provenientes de plantas crecidas en cajas plásticas se extrajeron de la raíz con un bisturí dejando aproximadamente 3 mm de raíz a cada lado del órgano. Posteriormente se los embebió en agarosa de bajo punto de fusión para no dañar el tejido y se obtuvieron tacos con nódulos para la disección con la ayuda de un bisturí. La disección en secciones longitudinales de 70 μm se realizó con un vibrátomo Leica VT-1000-S ajustando los parámetros en velocidad=8 y frecuencia=7,5. Los pequeños cortes obtenidos se recuperaron con un pincel y se embebieron en solución fisiológica. Para realizar la tinción, se retiró la solución fisiológica y se incubaron los cortes en 1 ml de solución fisiológica con 1 μl de yoduro de propidio y de Cyto9 (LIVE/DEAD BacLight, Thermo Scientific) por 30 min a temperatura ambiente. Estos reactivos se comercializan sólidos y la solución *stock* 1000X se los prepara según las instrucciones provistas por el fabricante. Posteriormente, se retiraron los reactivos y se procedió a la visualización del tejido utilizando un microscopio confocal Leica TCS SP2 ajustando los LASERs a las longitudes de onda de absorción/emisión de los reactivos utilizados. Las fotografías se obtuvieron con la cámara provista por el microscopio y por el *software* provisto por el fabricante.

2.16. Programas estadísticos utilizados

Para los análisis estadísticos de los datos, en este trabajo hemos utilizado los programas GraphPad (figuras del Capítulo 4 y Capítulo 7), el programa Perseus (en los análisis de proteínas del Capítulo 5) y el paquete estadístico provisto en el programa *on line* Metaboanalyst (<http://www.metaboanalyst.ca/>) para el análisis estadístico univariado y multivariado de los datos del Capítulo 6.

Predicción y clasificación de los
sistemas de dos componentes
presentes en *Ensifer meliloti* 2011

Capítulo 3

3.1. Introducción

En términos generales, los genes pertenecientes a TCS se definen en base a los métodos empleados para la búsqueda de genes homólogos y de los criterios que se empleen para la inferencia de homología. Con el objetivo de realizar una búsqueda sistemática de los TCS presentes en el genoma de *E. meliloti* 2011, Hagiwara y colaboradores realizaron un trabajo pionero en el que buscaron, compararon y clasificaron HKs y RRs en tres especies rizobianas: *Mesorhizobium loti*, *Bradyrhizobium japonicum* (reclasificado como *Bradyrhizobium diazoefficiens*) y *Sinorhizobium meliloti* (actualmente renombrado como *Ensifer meliloti*) (Hagiwara *et al.* 2004).

En la base de datos Gen DB (<http://www.cebitec.uni-bielefeld.de/CeBiTec/rhizogate/>), se encuentran disponibles las secuencias nucleotídicas completas del genoma de *E. meliloti*. Esta base de datos incluye organizaciones del genoma muy bien caracterizadas y un conjunto útil de herramientas de búsqueda. En la misma los componentes de los TCS se denominan "dos componentes", "sensor quinasa", "regulador de respuesta de dos componentes", "probable sensor/regulador de proteínas híbridas", y "proteína del sensor de respuesta". Sin embargo, fueron clasificados en la lista de categorías de genes de "funciones reguladoras", colectivamente junto con muchos otros productos genéticos con funciones reguladoras que aparentemente no son relevantes para la identificación de los componentes de los TCS. Esta base de datos se utilizó para realizar una búsqueda de similitud aminoacídica utilizando el motor de búsqueda BLAST (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y las secuencias de los ORFs (Marco Abierto de Lectura, del inglés **O**pen **R**eadin**G** **F**rame) predichos. Este programa realiza alineamientos locales de una secuencia problema contra una base de datos de genomas secuenciados con el fin de identificar proteínas similares (homólogas) en otros organismos. En bioinformática, la primera instancia en la clasificación de proteínas está relacionada con la presencia de dominios de proteínas. Este es el criterio que se utilizó en este capítulo para clasificar las proteínas de los TCS de *E. meliloti* 2011.

Las bases de datos de familias de proteínas Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) y SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1#) también se utilizaron con el mismo objetivo. Estas bases de datos contienen alineamientos múltiples de familias de

proteínas y utilizan esos alineamientos como punto de partida para alinear la proteína problema. Utilizamos estas estrategias bioinformáticas más robustas a fin de poner de manifiesto información no detectada en la búsqueda por BLAST.

Clasificar las HKs resulta un poco más complejo. Como se hizo referencia en el Capítulo 1, (Sección 1.9.1) en una HK se pueden identificar dos módulos: un **módulo sensor**, hipervariable, encargado de dar inicio a la cascada de señalización; y un **módulo transmisor**, con el doble rol de autofosforilarse y transferir el grupo fosfato a el/los reguladores. El módulo transmisor de estas proteínas contiene el dominio HATPasa_c, donde ocurre la hidrólisis de ATP; y el dominio HisKA (o DHp), que contiene una histidina conservada que recibe el grupo fosfato de dicha hidrólisis. Parte de la bioquímica de la traducción de señales ocurre en estos dos dominios, lo que convierte a este módulo en una región común de las quinasas y por ende poco útil para agruparlas. El módulo sensor, a su vez, tampoco es útil para tal fin por su alto grado de diversidad de dominios y topología de membrana. También hemos hecho referencia a las diversas funciones que poseen las HKs en relación a las RTM que poseen. En este sentido, conocer la topología de las HKs puede contribuir a la predicción de los procesos biológicos en los que estas proteínas intervienen. En la caracterización de las HKs de *E. meliloti* se utilizó el servidor TMHMM Server 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) para predecir las RTM de estas proteínas. Este motor de búsqueda utiliza un algoritmo de tipo HMM (del inglés, **Hidden Markov Model**) para predecir regiones de hélices α que atraviesan la membrana.

Considerando las particularidades de los TCS que hemos expuesto en la introducción de esta tesis y en base a los antecedentes reportados, en el presente capítulo avanzaremos en la identificación de los TCS presentes en *E. meliloti*. Comprender de modo más acabado la presencia, el entorno y el rol de los TCSs nos permitirá contar con un marco de referencia valioso para avanzar con los objetivos propuestos.

3.2. Resultados y discusión

3.2.1. Identificación de HKs y RRs presentes en el genoma de *Ensifer meliloti* 2011

Utilizando métodos *in silico* buscamos exhaustivamente ORFs que codifican para proteínas de TCSs en el genoma de *E. meliloti*. Realizamos la comparación de las secuencias traducidas de estos ORFs a través del programa BLASTP con el banco de datos de proteínas caracterizadas (Swissprot) y además se utilizaron los programas Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) y SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1#). El primero identifica proteínas similares (homólogas) realizando alineamientos locales de una secuencia problema contra una base de datos de genomas de otros organismos, mientras que los dos últimos son herramientas bioinformáticas más robustas que pueden poner de manifiesto información no detectada en la búsqueda por BLAST. Como resultado, se pudieron predecir **48 HKs y 60 RRs**, distribuidos de la siguiente manera: 21 HKs y 24 RRs están codificados en el cromosoma; 11 HKs y 17 RRs en el pSymA; 16 HKs y 19 RRs en el pSymB.

Frecuentemente, los genes que codifican para los TCS son de naturaleza policistrónica, es decir, las HKs y los RRs (y a veces algunas proteínas accesorias) forman parte de un operón y se transcriben en un único ARN mensajero. Asignar un vínculo funcional a pares HK-RR sólo por la ubicación y sintenia en el genoma, es un análisis prematuro pero útil a la hora de realizar una primera aproximación al rol de un TCS en un organismo determinado. Por otro lado, la existencia de HKs o RRs codificadas de manera monocistrónica, donde no es posible asociar directamente las proteínas a un TCS, también es habitual. A los genes de este tipo se los conoce como “huérfanos” (en inglés, *orphans*). Utilizamos la base de datos RhizoRegNet (Universidad de Bielefeld, Alemania), para identificar unidades transcripcionales (operones) que posean genes de TCSs (<http://www.cebitec.uni-bielefeld.de/CeBiTec/rhizogate/>) y así asociar HKs con RRs.

Además, realizamos un análisis detallado de las secuencias de los productos de dichos ORFs usando el programa Conserved Domains (www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi). Las Tablas 3.1 y 3.2 muestran las asociaciones predichas como así también los genes huérfanos encontrados en los tres replicones de *E. meliloti* (27 RRs y 20 HKs).

3.2.1. Histidina quinasas de *E. meliloti* 2011

En esta sección avanza en la predicción *in silico* y la clasificación de las HKs de acuerdo a las características más importantes y más frecuentes: la localización (citoplasma o membrana) y la presencia de dominios de tipo PAS y HAMP en las regiones sensoras. La Tabla 3.1 resume las características analizadas y las que se detallan a continuación.

Histidina quinasas citosólicas y de membrana presentes en *E. meliloti* 2011

Una HK típica procariota está compuesta por la región sensora flanqueada por dos segmentos transmembrana y la región catalítica ubicada en el citoplasma, inmediatamente después de uno de estos segmentos (Cheung y Hendrickson, 2010). En primer lugar, el análisis realizado utilizando el servidor TMHMM 2.0 indicó que en *E. meliloti* 2011 la mayoría de las HKs están ancladas a membrana (33/48). De aquellas asociadas a membrana, el 31% poseen 2 regiones transmembrana; el 34% cruza la membrana lipídica sólo una vez; y el resto lo hacen 3, 4, 5, 9, 12 y 14 veces. Las HKs restantes, probablemente estén destinadas a sensor situaciones citoplasmáticas (13 HKs).

Histidina quinasas híbridas en *E. meliloti* 2011

Como se mencionó, en el módulo catalítico se puede distinguir dos dominios: el dominio donde ocurre la dimerización de los monómeros y la fosforilación de la histidina conservada (DHp); y el dominio HATPase_c, con capacidad de unir e hidrolizar ATP.

Las HKs más comunes contienen en la región C-terminal solamente estos dos dominios, pero existen variantes que contienen además en este extremo un dominio REC. Los dominios REC son dominios típicos de RRs (ver Sección 1.9.4.1) y su presencia en HKs constituyen versiones un poco más complejas de TCS, donde la fosforilación proveniente de la histidina del dominio HisKA no es transmitida directamente a un dominio REC de un RR sino que es recibida por este tipo de dominio en la misma HK. Estas quinasas, conocidas como Histidina Quinasas Híbridas (HKh), son poco comunes en procariotas. En el caso particular de *E. meliloti* 2011, el 17% del total de las HKs identificadas corresponden a quinasas de este tipo.

Dominios PAS y HAMP en Histidina Quinasas de *E. meliloti* 2011

El dominio PAS (Huang *et al.* 1993) se lo suele encontrar en el extremo amino terminal de diversas proteínas de señalización. La función *per se* es llevada a cabo mediante interacciones proteína-proteína (Lee *et al.* 2008), transferencia de una señal hacia otro dominio (Oka *et al.* 2008) o, como en el caso de particular de las HKs, por la percepción directa de algún estímulo (Taylor y Zhulin 1999). Se ha observado que en estas proteínas los dominios PAS abundan en regiones extracitoplasmáticas (Chang *et al.* 2010) aunque también se suelen encontrar localizados dentro del citoplasma (Gilles-Gonzalez *et al.* 1994).

El dominio HAMP se encuentra no sólo en HKs sino también en otros tipos de proteínas de señalización como adenilciclasas, proteínas aceptoras de grupos metilos, y fosfatasas (de ahí su acrónimo en inglés, *Histidin-kinases*, *Adenilil ciclases*, *Methyl-accepting chemotaxis protein and Phosphatases*). Este dominio tiene un rol clave en la transferencia de la señal entre la región que detecta la señal (módulo sensor) y la región encargada de hidrolizar ATP y autofosforilarse (módulo transmisor). Los dominios HAMP consisten en dos hélices (con estructura *coiled-coil*) que se unen por un segmento conector con un motivo no definido. Se hipotetiza que en proteínas homodiméricas, como es el caso de las quinasas, esta estructura se organiza formando bucles de 4 hélices (Mascher *et al.* 2006).

Buscamos los dominios PAS y HAMP en HKs de *E. meliloti* 2011 y encontramos que de las 468 proteínas quinasas existentes, 17 poseen dominios PAS y 9 poseen dominios HAMP. Dentro de aquellas que tienen dominios PAS, 9 tienen solo uno y 7 tienen 2 o más (en tándem).

3.2.2. Reguladores de Respuesta de *E. meliloti* 2011

Los RRs se caracterizan por poseer, en el **módulo receptor**, dominios llamados REC donde ocurre la fosforilación de un aspartato. Los **módulos efectores**, por su parte, contienen dominios cuyas actividades están directamente relacionadas con el rol que cumplen estas proteínas en la célula.

El análisis de dominios de los RRs de *E. meliloti* 2011 mostró que, salvo el RR codificado en el *locus tag* SMb20702, todos los reguladores de respuesta poseen el dominio receptor REC característico de este tipo de proteínas. Además, se evidenció que casi un cuarto del total de

los RRs identificados consisten en proteínas pequeñas (120 - 130 aminoácidos de longitud) que solamente están constituidas por este dominio. Por ese motivo, estas proteínas fueron agrupadas dentro del grupo REC.

La mayoría de estas proteínas (78% del total) poseen además las regiones efectoras típicas en la región C-terminal. Los dominios presentes en estas regiones dan lugar a los distintos modos de acción de los RRs en la célula. Por lo general estas proteínas se unen a regiones específicas del ADN y actúan como factores de transcripción, aunque existen algunos que intervienen en diversas vías de regulación actuando como proteínas moduladoras.

Hagiwara y colaboradores (2004) clasificaron los RRs de algunos géneros de rizobios teniendo en cuenta la homología estructural que comparten con reguladores ya caracterizados en otros organismos (Hagiwara *et al.* 2004). Utilizando este criterio de clasificación, los RRs de *E. meliloti* 2011 fueron agrupados en este trabajo en grupos **OmpR** (16 miembros), **NarL** (13), **NtrC** (7), **PleD** (4), **PhyR** (2), **CheB** (2), **AmiR** (1), **LytR** (1). Al observar las características generales de estos 8 grupos planteados, se destaca que la mayoría de las proteínas contienen un dominio receptor REC y un dominio de unión a ADN (grupos OmpR, NarL, NtrC y LytR) o a ARN (grupo AmiR) y dan cuenta del 64% del total de los reguladores. En el caso particular del grupo NtrC, las proteínas poseen además un dominio de unión a ATP. Los restantes grupos contienen reguladores que poseen además de un dominio REC, dominios con actividades no involucradas en la unión a ADN o ARN. Entre ellos encontramos dominios de interacción con otras proteínas regulatorias (PhyR); dominios diguanilato ciclasa (PleD); y dominios con actividad metilesterasa (CheB).

La Figura 3.1 y la Tabla 3.2 expuestas a continuación, muestran la diversidad de RRs de *E. meliloti* 2011 que se desarrolló en esta sección.

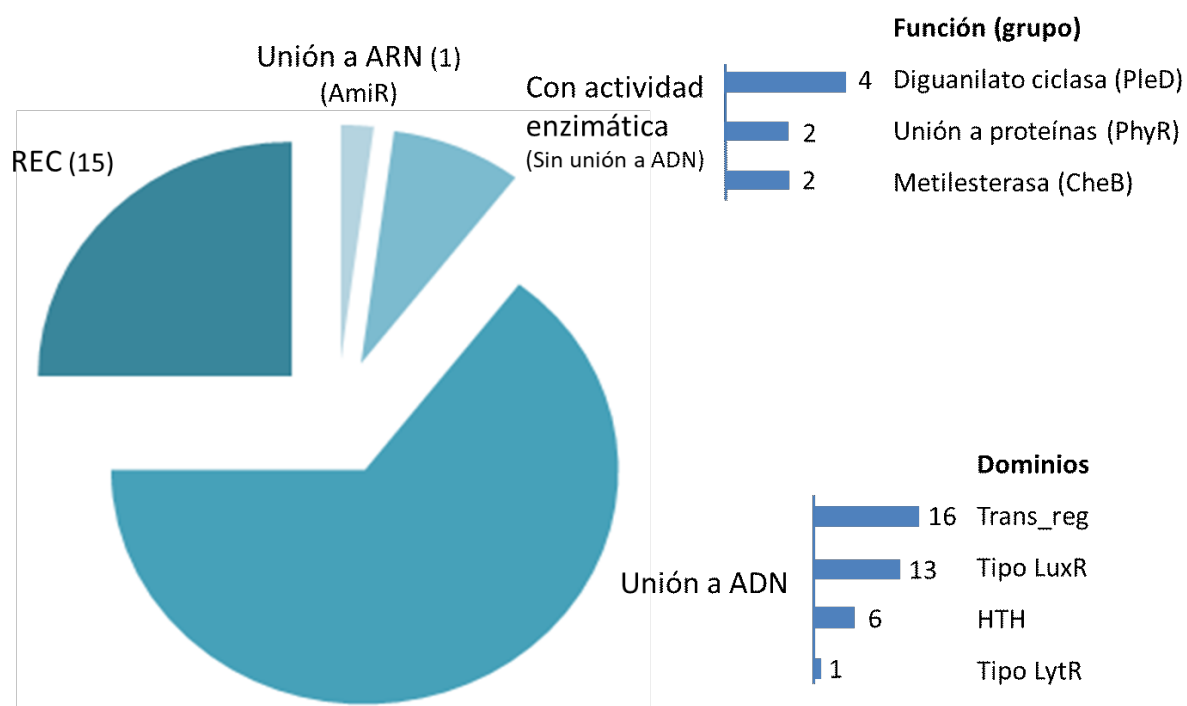


Figura 3. 1. Clasificación de los RRs presentes en el genoma de *E. meliloti* 2011.

La figura muestra la distribución de los RRs de *E. meliloti* 2011. Puede observarse que los reguladores más abundantes son los que tienen dominios de unión a ADN. Se muestran también aquellos reguladores que poseen sólo dominios receptores REC, los que se unen a ADN o ARN, y los que contienen otras actividades enzimáticas.

Tabla 3. 1. HKs identificadas *in silico* o con función asignada presentes en el genoma de *E. meliloti* 2011.

<i>Locus tag/gen</i>	Replicón	Tipo	Localización (RTM)	RR asociado	Dominio PAS	Dominio HAMP	Referencia
SMa0113	pSymA	HK	membrana (1)	SMa0114	5	-	(Garcia <i>et al.</i> 2010)
SMa0204	pSymA	HK	citosol	SMa0206	1	-	-
SMa0939	pSymA	HK	membrana (5)	SMa0940	1	1	-
SMa1001	pSymA	HK	membrana (2)	-	-	-	-
SMa1142	pSymA	HK	membrana (5)	-	-	-	-
SMa1229/ <i>fixL</i>	pSymA	HKh	membrana (14)	SMa1227/ <i>fixJ</i>	-	-	(David <i>et al.</i> 1988)
SMa1558	pSymA	HK	membrana (3)	SMa1550	1	-	-
SMa2327/ <i>kpdD</i>	pSymA	HK	membrana (3)	SMa2325/ <i>kpdE</i>	-	-	(Domínguez-Ferreras <i>et al.</i> 2009)
SMa1684	pSymA	HK	citosol	SMa1688	-	-	-
SMa1696	pSymA	HK	membrana (1)	-	-	-	-
SMa2063	pSymA	HKh	citosol	-	1	-	-
SMb20077	pSymB	HK	membrana (2)	SMb20078	-	-	-
SMb20164	pSymB	HK	membrana (2)	SMb20162	-	-	-
SMb20218	pSymB	HK	membrana (2)	SMb20219	-	1	-
SMb20356	pSymB	HK	membrana (1)	SMb20357	1	-	-
SMb20467	pSymB	HK	membrana (2)	SMb20468	-	1	-
SMb20609	pSymB	HK	membrana (1)	-	-	1	-
SMb20612/ <i>dctB</i>	pSymB	HK	membrana (2)	SMb20613/ <i>dctD</i>	-	-	(Ronson <i>et al.</i> 1987)
SMb20721	pSymB	HK	membrana (1)	SMb20722	-	1	-
SMb20868	pSymB	HK	membrana (1)	-	-	1	-
SMb20933/ <i>exsG</i>	pSymB	HK	membrana (3)	SMb20934/ <i>exsF</i>	2	-	-
SMb21201	pSymB	HK	membrana (1)	SMb21200	-	-	-
SMb21209	pSymB	HK	membrana (5)	-	-	-	-
SMb21519	pSymB	HK	citosol	SMb21520	-	-	-

Tabla 3.1. Continuación

<i>Locus tag/gen</i>	Replicón	Tipo	Localización (RTM)	RR asociado	Dominio PAS	Dominio HAMP	Referencia
SMb21546	pSymB	HKh	citosol	SMb21545	-	-	-
SMb21560	pSymB	HK	membrana (5)	SMb21561	-	-	-
SMb21574	pSymB	HK	citosol	-	5	-	-
SMc00059/ <i>divJ</i>	Cromosoma	HK	citosol	-	3	-	(Pini <i>et al.</i> 2013)
SMc00129/ <i>feuQ</i>	Cromosoma	HK	membrana (4)	SMc00458/ <i>feuP</i>	-	-	(Griffitts <i>et al.</i> 2008)
SMc00322	Cromosoma	HK	membrana (4)	-	-	-	-
SMc00471/ <i>cckA</i>	Cromosoma	HKh	citosol	-	1	-	(Jacobs <i>et al.</i> 2003)
SMc00776/ <i>cbrA</i>	Cromosoma	HK	citosol	-	-	-	(Sadowski <i>et al.</i> 2013)
SMc01042/ <i>ntrB</i>	Cromosoma	HK	citosol	SMc01043/ <i>ntrC</i>	-	-	(Patriarca <i>et al.</i> 1993)
SMc01044/ <i>ntrY</i>	Cromosoma	HK	citosol	SMc01045/ <i>ntrX</i>	-	-	(D. Wang <i>et al.</i> 2013)
SMc01128	Cromosoma	HK	membrana (2)	-	-	-	-
SMc01507/ <i>rsiC</i>	Cromosoma	HKh	membrana (2)	-	3	-	(Sauviac y Bruand 2014b)
SMc01595	Cromosoma	HK	citosol	SMc01593	2	-	-
SMc01716	Cromosoma	HKh	membrana (1)	-	1	-	-
SMc02147/ <i>phoR</i>	Cromosoma	HK	membrana (2)	-	-	1	-
SMc02249	Cromosoma	HKh	membrana (12)	-	1	-	-
SMc02367	Cromosoma	HK	membrana (2)	SMc02366	-	-	Este trabajo
SMc02369	Cromosoma	HK	membrana (9)	-	4	-	-
SMc02585/ <i>actS</i>	Cromosoma	HK	citosol	SMc02584/ <i>actR</i>	-	-	(Tang <i>et al.</i> 2017; Tiwari <i>et al.</i> 1996)
SMc02756	Cromosoma	HKh	membrana (1)	-	1	1	-
SMc03007/ <i>cheA</i>	Cromosoma	HK	membrana (1)	SMc03006/ <i>cheY1</i>	-	1	(Dogra <i>et al.</i> 2012)
SMc04212	Cromosoma	HK	membrana (1)	-	3	-	-
SMc04446/ <i>exoS</i>	Cromosoma	HKh	membrana (1)	SMc02560/ <i>chvI</i>	-	1	(Chen <i>et al.</i> 2008)

Referencias: pSymA, plásmido simbiótico A; pSymB, plásmido simbiótico B; HK, Histidina Quinasa típica; HKh, Histidina Quinasa híbrida; RTM, regiones transmembrana.

Tabla 3. 2. RRs identificados *in silico* presentes en el genoma de *E. meliloti* 2011.

<i>Locus tag/gen</i>	Replicón	Grupo	Dominios N/C-terminal	Histidina quinasa asociada	Referencia
SMb21115	pSymB	AmiR	REC/ANTAR	-	-
SMc03010/ <i>cheB</i>	Cromosoma	CheB	REC/CheB_like	SMc03007/ <i>cheA</i>	(Greck <i>et al.</i> 1995)
SMa1561/ <i>cheB2</i>	pSymA	CheB	REC/CheB_like	SMa1558	-
SMb21545	pSymB	LytR	REC/LytR	SMb21546	-
SMb20468	pSymB	NarL	REC/LuxR_C_like	SMb20467	-
SMa1227/ <i>fixJ</i>	pSymA	NarL	REC/LuxR_C_like	SMa1229/ <i>fixL</i>	(Akimoto <i>et al.</i> 2003; David <i>et al.</i> 1988)
SMa0940	pSymA	NarL	REC/LuxR_C_like	SMa0939	-
SMa1686	pSymA	NarL	REC/LuxR_C_like	-	-
SMb20869	pSymB	NarL	REC/LuxR_C_like	-	-
SMa0206	pSymA	NarL	REC/LuxR_C_like	SMa0204	-
SMb20162	pSymB	NarL	REC/LuxR_C_like	SMb20164	-
SMb21520	pSymB	NarL	REC/LuxR_C_like	SMb21519	-
SMc02248	Cromosoma	NarL	REC/LuxR_C_like	-	-
SMb21080	pSymB	NarL	REC/LuxR_C_like	-	-
SMa1550	pSymA	NarL	REC/LuxR_C_like	SMa1558	-
SMb20078	pSymB	NarL	REC/LuxR_C_like	SMb20077	-
SMa0759	pSymA	NarL	REC/LuxR_C_like	-	-
SMb20613/ <i>dctD</i>	pSymB	NtrC	REC/ABC_ATPasa	SMb20612/ <i>dctB</i>	(Ronson <i>et al.</i> 1987)
SMc01043/ <i>ntrC</i>	Cromosoma	NtrC	REC/ABC_ATPasa/HTH	SMc01042/ <i>ntrB</i>	(Patriarca <i>et al.</i> 1993)
SMc04011/ <i>tacA</i>	Cromosoma	NtrC	REC/ABC_ATPasa/HTH	-	-
SMc02584/ <i>actR</i>	Cromosoma	NtrC	REC/ABC_ATPasa/HTH	SMc02585/ <i>actS</i>	(Tang <i>et al.</i> 2017; Tiwari <i>et al.</i> 1996)
SMc01045/ <i>ntrX</i>	Cromosoma	NtrC	REC/ABC_ATPasa/HTH	SMc01044/ <i>ntrY</i>	(Wang <i>et al.</i> 2013)
SMb21200	pSymB	NtrC	REC/ABC_ATPasa/HTH	SMb21201	-
SMa0760/ <i>fixT2</i>	pSymA	NtrC	REC/ABC_ATPasa/HTH	-	(Foussard <i>et al.</i> 1997)
SMb20610	pSymB	OmpR	REC/trans_reg_C	SMb2069	-
SMc01593	Cromosoma	OmpR	REC/trans_reg_C	SMc01595	-
SMc02366	Cromosoma	OmpR	REC/trans_reg_C	SMc02367	Este trabajo

Tabla 3.2. Continuación

<i>Locus tag/gen</i>	Replicón	Grupo	Dominios N/C-terminal	Histidina quinasa asociada	Referencia
SMb20219	pSymB	OmpR	REC/trans_reg_C	SMb20218	-
SMb21210	pSymB	OmpR	REC/trans_reg_C	SMb21219	-
SMA1138	pSymA	OmpR	REC/trans_reg_C	-	-
SMc03046/ <i>ftcR</i>	Cromosoma	OmpR	REC/trans_reg_C	-	(Léonard <i>et al.</i> 2007)
SMA0961/ <i>rctC</i>	pSymA	OmpR	REC/trans_reg_C	-	(Nogales <i>et al.</i> 2013)
SMc00654/ <i>ctrA</i>	Cromosoma	OmpR	REC/trans_reg_C	-	(Barnett <i>et al.</i> 2001a)
SMA0969	pSymA	OmpR	REC/trans_reg_C	-	-
SMA2325/ <i>kpdE</i>	pSymA	OmpR	REC/trans_reg_C	-SMA2327/ <i>kpdD</i>	(Domínguez-Ferreras <i>et al.</i> 2009)
SMc00458/ <i>feuP</i>	Cromosoma	OmpR	REC/trans_reg_C	SMc00129/ <i>feuQ</i>	(Griffitts <i>et al.</i> 2008)
SMb21561	pSymB	OmpR	REC/trans_reg_C	SMb21560	-
SMc02560/ <i>chvI</i>	Cromosoma	OmpR	REC/trans_reg_C	SMc04446/ <i>exoS</i>	(Wang <i>et al.</i> 2010)
SMc03820	Cromosoma	OmpR	REC/trans_reg_C	-	-
SMb20722	pSymB	OmpR	REC/trans_reg_C	SMb20721	-
SMc00794/ <i>RsiB2</i>	Cromosoma	PhyR	RpoE/REC	-	(Bastiat <i>et al.</i> 2010)
SMc01504/ <i>RsiB1</i>	Cromosoma	PhyR	REC	-	(Bastiat <i>et al.</i> 2010)
SMc01370/ <i>pleD</i>	Cromosoma	PleD	GGDEF	-	-
SMc04170	Cromosoma	PleD	REC	-	-
SMb20358	pSymB	PleD	HisKA/REC/GGDEF	-	-
SMA2301	pSymA	PleD	GGDEF	-	-
SMA0941	pSymA	REC	REC	SMA0939	-
SMc03006/ <i>cheY1</i>	Cromosoma	REC	REC	SMc03007/ <i>cheA</i>	(Dogra <i>et al.</i> 2012)
SMb20934/ <i>exsF</i>	pSymB	REC	REC	SMb20933/ <i>exsG</i>	-
SMc00653	Cromosoma	REC	REC	-	-
SMc04044/ <i>cpdR1</i>	Cromosoma	REC	REC	-	(Kobayashi <i>et al.</i> 2009)
SMc00720	Cromosoma	REC	REC	-	-
SMc01371/ <i>divK</i>	Cromosoma	REC	REC	-	(Pini <i>et al.</i> 2013)

Tabla 3.2. Continuación

<i>Locus tag/gen</i>	Replicón	Grupo	Dominios N/C-terminal	Histidina quinasa asociada	Referencia
SMc01953	Cromosoma	REC	REC	-	-
SMa1688	pSymA	REC	REC	SMa1684	-
SMa1139	pSymA	REC	REC	-	-
SMc03011/ <i>cheY2</i>	Cromosoma	REC	REC	SMc03007/ <i>cheA</i>	(Greck <i>et al.</i> 1995)
SMa0114	pSymA	REC	REC	SMa0113	(Garcia <i>et al.</i> 2010)
SMb20357	pSymB	REC	REC	SMb20356	-
SMb20702	pSymB	TolB	trans_reg_C/TolB_N/TPR	-	-

Referencias: pSym A, plásmido simbiótico A; pSymB, plásmido simbiótico B.

3.3. Conclusiones

Se ha reportado que el número de proteínas involucradas en TCS es mayor tanto en organismos que tienen la capacidad de adaptarse a diversos ambientes y desarrollar distintos tipos de vida (Capra y Laub 2012b; Galperin *et al.* 2001; Koretke *et al.* 2000), como en los que poseen genomas de mayor tamaño. Con respecto a esta última observación, hemos mencionado en la Sección 1.9 que el número de TCS de organismos procariotas aumenta con el cuadrado del tamaño de sus genomas (Michael y Galperin 2005). En este contexto, podemos hipotetizar que el número elevado de HKs y RRs (48 y 60 respectivamente) identificados en *E. meliloti* 2011 probablemente sea debido a : *i*) que es una de las tácticas moleculares más comunes y evolutivamente conservadas en bacterias para la transducción de señales intracelulares en respuesta a una gran variedad de estímulos externos y a los profundos cambios metabólicos que este organismo experimenta en sus posibles tipos de vida y *ii*) la posibilidad de ubicar sistemas de este tipo en un genoma que, por sus 6,7 Mb de tamaño, que codifican para un total de 6339 proteínas, es considerado grande en organismos procariotas.

La tendencia mayoritaria tanto de las HKs localizadas en la membrana, como de RRs con dominios de unión a ADN, o que sólo tienen dominios REC identificados en el genoma de *E. meliloti* 2011, es consistente con lo que se observa en procariotas en general (Michael y Galperin 2005, 2006; Gao *et al.* 2007). Sin embargo, el 17% de las HKh encontradas en este rizobio es un poco menor que el 25% de presencia reportado en los demás procariotas (Cock y Whitworth 2007), indicando que la existencia de estas proteínas en *E. meliloti* 2011, y quizá en rizobios en general, es menos común.

Al analizar la distribución de los TCS en el genoma, se puede observar que del total de los 108 HKs y RRs predichos, 61 están codificados como genes contiguos y el resto forma parte de genes que codifican para proteínas huérfanas. El elevado número de proteínas huérfanas genera un interrogante muy grande acerca del rol que cumplen en la fisiología bacteriana, ya que al realizar estudios funcionales no se parte de ningún indicio que vincule una HK con un RR como unidad funcional. En el caso particular de *Caulobacter crescentus*, organismo modelo para estudiar la regulación del ciclo celular y la división asimétrica (Collier 2016), se ha demostrado que existen mecanismos de regulación del ciclo celular de que están bajo el

control de varias HKs y RRs huérfanos (Curtis y Brun 2010, Hung y Shapiro 2002, Iniesta *et al.* 2006). En *E. meliloti* se han identificado proteínas homólogas a las que forman parte de la compleja regulación del ciclo celular en *C. crescentus* (CtrA, DivK, DivJ y CpdR). Sus funciones en este rizobio están siendo activamente estudiadas (Barnett *et al.* 2001b; Kobayashi *et al.* 2009; Pini *et al.* 2013; Sadowski *et al.* 2013; Schallies *et al.* 2015).

En referencia a los pares HK y RR que posiblemente estén formando una unidad funcional, **es destacable que son pocos los genes anotados en bases de datos que además posean estudios funcionales en especies rizobianas**. Por ejemplo, la acción del regulador FtcR en la expresión de proteínas del flagelo está demostrada en *Brucella melitensis* 16M (otra α -proteobacteria que también posee un estilo de vida intracelular en su respectivo huésped, y es filogenéticamente cercana a *E. meliloti*) pero el rol de su homólogo en la familia Rhizobiaceae aún no ha sido demostrado (Léonard *et al.* 2007).

Entre los TCS más estudiados en rizobios podemos mencionar el sistema DctD/DctB, involucrado en la captación y utilización de ácidos dicarboxílicos de 4 carbonos (Garcia *et al.* 2010); el sistema NtrX/NtrY, un TCS pleiotrópico relacionado con la producción de exopolisacáridos, movilidad y simbiosis (Wang *et al.* 2013); el sistema FeuQ/FeuP que regula positivamente la expresión de un transportador de glicanos cíclicos, importantes para el proceso de infección (Carlyon *et al.* 2010; Griffiths *et al.* 2008); y el sistema FixJ/FixL, encargado de estimular la expresión del complejo de la nitrogenasa y las enzimas necesarias para llevar a cabo la respiración microaeróbica en etapas más avanzadas de la simbiosis (David *et al.* 1988).

Con frecuencia, los rizobios suelen estar sometidos a situaciones adversas, llamadas de estrés. La respuesta general a estrés (GSR, **General Stress Response**) es una respuesta adaptativa global que se dispara frente a varios estreses. La expresión de los genes responsables de la GSR está controlada por los llamados factores σ , que son los encargados de direccionar al complejo de la ARN polimerasa a los promotores de ciertos genes. En *E. meliloti*, se conoce que los reguladores huérfanos RsiB1, RsiB2 y la HK huérfana RsiC están involucrados en esta compleja regulación (Bastiat *et al.* 2010; Sauviac y Bruand 2014a). Por otro lado, también son frecuentes los TCS relacionados con las respuestas específicas a una situación de estrés particular. Como mencionamos en el Capítulo 1 (Sección 1.9), los rizobios suelen estar expuestos a ambientes ácidos (suelo, hilo de infección, simbiosoma), por lo que

el estudio funcional de los TCS relacionados con la tolerancia a este estrés resulta de gran importancia. En particular, en la cepa tolerante a la acidez *S. medicae* WSM419, se demostró que el TCS ActR/ActS juega un rol importante en la tolerancia a la acidez (Tiwari *et al.* 1996) y recientemente se encontró que el TCS homólogo en *E. meliloti* está involucrado en la tolerancia a bajo pH y al estrés oxidativo (Tang *et al.* 2017). **En la literatura no existe evidencia de otros TCS que posean un rol específico en la tolerancia a la acidez.**

La caracterización funcional de los TCS y de los mecanismos moleculares que determinan su actividad permitirá establecer el rol de los mismos en *E. meliloti* y extender los criterios de búsqueda y análisis funcional en otras (rizo)bacterias relacionadas. En este sentido, en el siguiente capítulo se construirán y compararán los fenotipos de mutantes en RRs, isogénicos a la cepa modelo *E. meliloti* 2011, en búsqueda de eventuales productos génicos asociados a efectos específicos de tolerancia a estrés. Dichos ensayos nos proporcionarán una base crucial para avanzar en la comprensión del rol de los TCS en la biología de *E. meliloti*.

Rol de los sistemas de dos
componentes en la tolerancia a la
acidez de *Ensifer meliloti*:
identificación, caracterización
funcional en vida libre y predicción
de sus vínculos evolutivos

Capítulo 4

4.1. Introducción

Las bacterias sometidas a un estrés ambiental regulan sus actividades metabólicas para dar lugar a un fenotipo de adaptación al entorno desfavorable. La fisiología de adaptación es principalmente el resultado de profundos cambios en la inducción y represión de genes donde los TCS cumplen un rol preponderante. Los rizobios en particular, suelen estar sometidos a una amplia variedad de estreses ambientales tanto en el suelo como en la vida simbiótica (Sección 1.6). Como resultado, el cultivo resulta seriamente restringido debido a una menor supervivencia de los rizobios o de la planta huésped, una pobre nodulación y bajos rendimientos de forraje y semilla.

La acidez del suelo es una de las causas principales que limitan el establecimiento de la simbiosis. La distribución elevada a nivel local e internacional de estos suelos y la notable sensibilidad del microsimbionte a esta condición, estimula la investigación sobre las respuestas de los simbioses a ambientes ácidos. En este contexto, la caracterización de los TCS presentes en *E. meliloti* que intervienen en el desarrollo de la fisiología adaptativa al estrés ácido, no ha sido aun completamente evaluada.

Con el objetivo de avanzar en la identificación y en el estudio de TCS que posean funciones asociadas a la adaptación al estrés ácido en *E. meliloti* en particular, en este capítulo presentamos la búsqueda, identificación y posterior caracterización en vida libre de un posible TCS (Capítulo 5 y Capítulo 6) relacionado con la tolerancia a estrés ácido. Este sistema, compuesto por el RR SMc02366 y la HK SMc02367, hasta ahora no ha sido explorado en *E. meliloti* 2011. Posteriormente en el Capítulo 7 haremos referencia al rol de dicho TCS en simbiosis. Particularmente analizaremos su rol en la eficiencia de la fijación simbiótica de nitrógeno; y los efectos de su delección sobre etapas tempranas y tardías del proceso simbiótico.

4.2 Resultados y discusión

4.2.1. Generación de una colección de mutantes en genes que codifican para posibles reguladores de respuesta en *E. meliloti* 2011.

Con el objetivo de dilucidar cuáles TCS de *E. meliloti* pueden estar involucrados en la tolerancia a estrés ácido, nos propusimos evaluar la respuesta a condiciones ácidas de una colección de mutantes de RRs. Aquellos mutantes que estuvieran afectados brindarían un indicio concreto de un posible rol en la adaptación a dicho estrés.

En una primera etapa se procedió a armar una colección de cepas mutantes en RRs isogénicas a *E. meliloti* 2011. Con este propósito se estableció una colaboración entre nuestro grupo y la Dra. Becker (SYNMIKRO, Alemania), que dispone de una biblioteca de aproximadamente 12.000 mutantes de *E. meliloti* desarrollada por Pobigaylo y colaboradores (Pobigaylo *et al.* 2006). Dicha biblioteca fue construida con diferentes variantes de *Tn5* portadoras de secuencias identificatorias de cada *Tn5* (STM, *Signature Tagged Mutagenesis*) y puede ser consultada en la base de datos del laboratorio de la Dra. Becker en el siguiente sitio de internet: http://synmikro.com/images/agbecker/primer/mapped_mTn5-STM_Rm2011_mutants.txt.

Teniendo en cuenta la disponibilidad de esta colección y nuestro interés en explorar el grado de relevancia de los TCS para sustentar el crecimiento de la bacteria en condiciones ácidas, solicitamos todos los mutantes en posibles RRs que estaban almacenados. Así, pudimos acceder a un conjunto de 23 mutantes de interés (Tabla 4.1). Además, dicha colección se complementó con la construcción de 14 mutantes de inserción en los cuales la secuencia de los RRs se interrumpió mediante eventos de recombinación homóloga simple (RHS) de un fragmento interno de cada gen contenido en un plásmido no replicativo. Para verificar la inserción del plásmido en estos mutantes se realizó un chequeo por PCR según se indica en el Capítulo 2 (Sección 2.3). En total se obtuvo una colección de mutantes isogénicos de *E. meliloti* 2011 (Tabla 4.1) que representa casi la mitad del total de los RRs identificados *in silico* en este organismo.

Tabla 4. 1. Lista de mutantes utilizados para la búsqueda de RRs implicados en la tolerancia a estrés.

La tabla muestra la anotación del gen, el replicón que lo contiene y el método empleado en la construcción de cada mutante. *Tn5*: mutantes obtenidos por inserción de un transposón *Tn5* (Pobigaylo *et al.* 2006); RHS: mutantes contruidos por recombinación homóloga simple.

<i>Locus tag/gen</i>	Replicón	Estrategia de mutación	Referencia
SMc00158	Cromosoma	<i>Tn5</i>	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMc01043/ <i>ntrC</i>	Cromosoma	RHS	Este trabajo.
SMc01504/ <i>rsiB1</i>	Cromosoma	<i>Tn5</i>	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMc01593	Cromosoma	<i>Tn5</i>	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMc02248	Cromosoma	RHS	Este trabajo.
SMc02366	Cromosoma	RHS	Este trabajo.
SMc04044/ <i>cpdR1</i>	Cromosoma	RHS	Este trabajo.
SMc03006/ <i>cheY1</i>	Cromosoma	<i>Tn5</i>	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMc03046/ <i>ftcR</i>	Cromosoma	<i>Tn5</i>	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMc04011/ <i>tacA</i>	Cromosoma	<i>Tn5</i>	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMc04170	Cromosoma	RHS	Este trabajo.
SMA0206	pSymA	RHS	Este trabajo.
SMA0940	pSymA	<i>Tn5</i>	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMA0941	pSymA	<i>Tn5</i>	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMA0961/ <i>rctC</i>	pSymA	<i>Tn5</i>	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMA0969	pSymA	<i>Tn5</i>	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMA1138	pSymA	<i>Tn5</i>	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMA1227/ <i>fixJ</i>	pSymA	RHS	Este trabajo.
SMA1550	pSymA	<i>Tn5</i>	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMA1561	pSymA	<i>Tn5</i>	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMA1686	pSymA	<i>Tn5</i>	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMA2301	pSymA	RHS	Este trabajo.
SMA2325/ <i>kpdE</i>	pSymA	RHS	Este trabajo.
SMA2327	pSymA	RHS	Este trabajo.
SMb20078	pSymB	<i>Tn5</i>	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMb20162	pSymB	RHS	Este trabajo.
SMb20219	pSymB	<i>Tn5</i>	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMb20468	pSymB	RHS	Este trabajo.
SMb20610	pSymB	<i>Tn5</i>	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMb20613/ <i>dctD</i>	pSymB	<i>Tn5</i>	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMb20702	pSymB	<i>Tn5</i>	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMb20869	pSymB	<i>Tn5</i>	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMb20934/ <i>exsF</i>	pSymB	<i>Tn5</i>	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMb21080	pSymB	RHS	Este trabajo.
SMb21115	pSymB	RHS	Este trabajo.
SMb21210	pSymB	<i>Tn5</i>	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)
SMb21520	pSymB	<i>Tn5</i>	(Pobigaylo <i>et al.</i> 2006)

4.2.2. Identificación de mutantes de *E. meliloti* 2011 que presenten fenotipos diferenciales en la capacidad de la bacteria para crecer en acidez

Un aspecto importante que se analizó fue la elección del medio de cultivo para evaluar el crecimiento de los mutantes en RR. Se analizaron las curvas de crecimiento de la cepa *E. meliloti* 2011 salvaje utilizando medios mínimos JMM (O'Hara *et al.* 1989), Evans (Evans 1970) y GS (Del Papa *et al.* 1999). Estos medios de cultivo han sido utilizado por estos autores en el estudio de la biología de los rizobios en condiciones ácidas. De todos ellos, el medio mínimo GS fue el elegido para los estudios fenotípicos porque fue el único que, al final de los ensayos, conservaba el pH dentro del rango de valores requerido para nuestro análisis. Ha sido descrito que el tiempo de generación de *E. meliloti* en cultivo aumenta al bajar de pH neutro a pH 6, y el crecimiento prácticamente se detiene a pH 5,5 (Glenn *et al.* 1994; Tiwari *et al.* 1992). Además cuando cepas de *E. meliloti* son crecidas en medio moderadamente ácido el pH suele modificarse ligeramente, por lo cual es necesario tamponar el medio de cultivo para trabajar con condiciones estables de pH. En particular el medio GS contiene sacarosa y glutamato de sodio como fuentes de carbono y nitrógeno, y utiliza el *buffers* biológicos para mantener el pH estable (ver Capítulo 2, sección 2.1.1). Con el fin de identificar mutantes afectados en el crecimiento en condición de estrés ácido, se eligió el valor de pH= 5,60 como condición subletal de estrés ácido.

Se caracterizaron las propiedades de crecimiento de los mutantes presentados en la Tabla 4.1 en cultivos *batch* a fin de poner de manifiesto posibles alteraciones fenotípicas. Se analizaron las velocidades máximas de crecimiento (μ) de estas cepas en medio mínimo GS pH=5,60 y se compararon con el valor μ de cultivos de *E. meliloti* 2011 salvaje.

Como condición de control, se analizaron los valores μ de cultivos de *E. meliloti* 2011 salvaje y los mutantes cultivados a pH=7,0 (pH óptimo). Si en esta condición una cepa presentara un valor de μ que se aparte significativamente del correspondiente a la cepa salvaje, será indicativo que el RR (interrumpido) estaría involucrado en procesos metabólicos basales no necesariamente vinculados con la tolerancia a la acidez.

Se analizaron las curvas de crecimiento y compararon las μ de los 37 mutantes. En dicho análisis se observó que el mutante en el RR SMC02366 (Eme RR⁻), está afectado en su tolerancia a la acidez. Esta cepa presentó un comportamiento comparable con la cepa salvaje a pH 7,0 tanto en la evolución de la densidad óptica a 600nm (DO₆₀₀), como en el recuento a lo largo del cultivo. La Figura 4.1 muestra los valores μ de las cepas cultivadas en ambas condiciones de pH. Se puede observar que en condiciones neutras no hay diferencias significativas entre la μ de la cepa mutante y la μ de la cepa parental (Eme wt). Sin embargo, a pH 5,60 se observa que la cepa mutante presenta una μ significativamente menor que la de la cepa salvaje. Esta observación es indicativa que el producto de expresión del gen SMC02366 estaría involucrado (directa o indirectamente) en el crecimiento y/o adaptación condiciones ácidas.

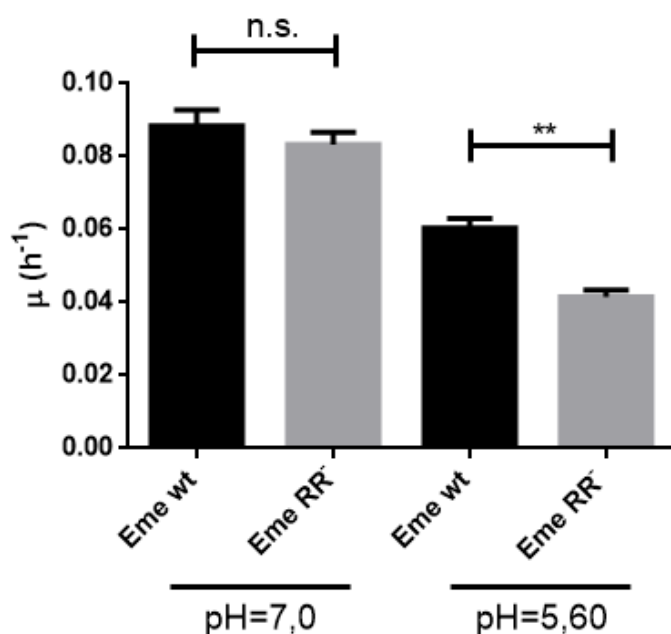


Figura 4. 1. Análisis de la velocidad máxima de crecimiento del mutante en el RR SMC02366 en medio ácido.

El gráfico indica las medias de valores μ de tres cultivos independientes realizados en medio mínimo GS con el pH ajustado a 7,0 o 5,6. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media (\pm SD). El análisis estadístico corresponde a un análisis de varianza (ANOVA) con un valor $^{**}p < 0,05$ de significancia. n.s.: no significativo, Eme wt, *Ensifer meliloti* 2011 salvaje; Eme RR⁻, *Ensifer meliloti* 2011 mutante por RHS en RR SMC02366.

4.2.3. Comportamiento del mutante RR SMC02366 frente a otros estreses abióticos

En ocasiones, los TCS bacterianos pueden ser responsables de la adaptación a diversos estreses abióticos. Este tipo de fenotipo es el que se observa en la llamada **respuesta general a estrés** (conocido en la bibliografía como GSR, del inglés *General Stress Response*). La GSR está descrita como una respuesta adaptativa global que se dispara frente a varios

estreses (Francez-Charlot *et al.* 2015). Con el objetivo de evaluar entonces si el RR SMc02366 tiene alguna relevancia en la tolerancia a otros estreses abióticos además de la observada en estrés ácido, analizamos la capacidad del mutante Eme RR⁻, de crecer en condiciones de estrés salino (500mM) y estrés por temperatura (42°C). En la Figura 4.2 podemos observar que bajo estos estreses la cepa mutante presenta el mismo comportamiento que la cepa salvaje. Este análisis es útil para descartar un posible vínculo del TCS en estudio con una respuesta de tipo GSR, ya que estos estreses suelen formar parte de una respuesta general adaptativa.

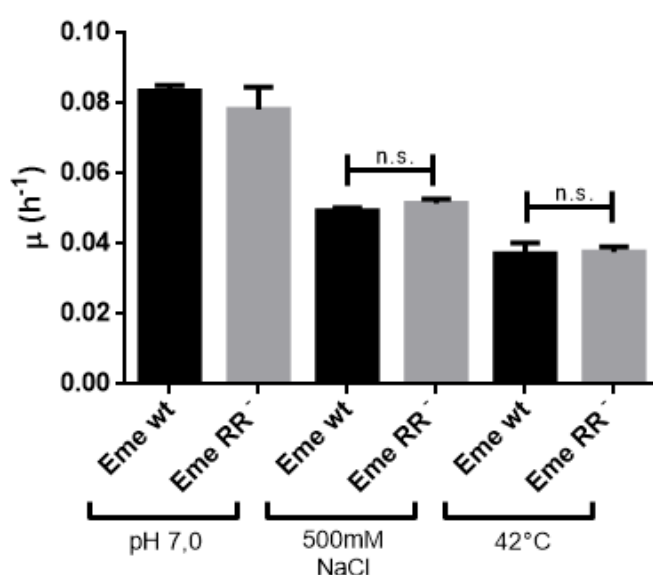


Figura 4. 2. Análisis de la velocidad máxima de crecimiento del mutante RR SMc02366 en condiciones de estrés salino y estrés por alta temperatura.

La gráfica muestra la velocidades máximas de crecimiento (μ) de cultivos *batch* en medio GS a 28°C con o sin el agregado de NaCl; o crecidos a 42°C. Los valores μ corresponden al promedio de tres ensayos independientes. Las barras de error indican la desviación estándar de la media (\pm SD) y el análisis estadístico corresponde a un análisis ANOVA con un $p < 0,01$ de significancia. n.s.: no significativo, Eme wt, *Ensifer meliloti* 2011 salvaje; Eme RR⁻, *Ensifer meliloti* 2011 mutante por RHS en RR SMc02366.

4.2.4. SMc02366 forma parte de una unidad transcripcional predicha *in silico*: Identificación y caracterización de los genes que componen el operón

Análisis *in silico* de la región genómica que contiene al RR SMc02366

El genoma de *E. meliloti* 2011 está completamente secuenciado desde hace más de una década (Galibert *et al.* 2001) y anotado en bases de datos *on line*. Utilizando estos servidores, se puede visualizar que inmediatamente después del posible RR SMc02366 existe un ORF de un gen que codifica para una posible HK (SMc02367). A continuación de dicho gen y luego de una región no codificante de pocos nucleótidos, existe un ORF predicho que codifica para una posible glutamina sintetasa (GlnE) aún no caracterizada en rizobios (Figura

4.3). La proteína GlnE de *Mycobacterium tuberculosis* comparte un 29% de identidad (BLASTP) y su función está relacionada con la síntesis de glutamina a partir de glutamato y amonio en condiciones de nitrógeno limitante (Parish y Stoker 2000). Corriente abajo y antisense de *glnE*, se encuentra un ORF que codifica para otra HK (SMc02369) aún no caracterizada. Corriente arriba del RR, encontramos un gen que codifica la proteasa DegP1 de localización periplásmica. En *E. coli*, se ha descrito esta proteína como involucrada en la degradación de proteínas mal plegadas debido a situaciones de estrés producto de una alteración en la membrana externa (Danese *et al.* 1995). En *E. meliloti* se ha demostrado que la transcripción de este gen se estimula cuando el rizobio se cultiva en condiciones de acidez (Draghi *et al.* 2016).

La organización de genes que codifican proteínas en operones es una característica común en genomas bacterianos. Recientemente, Schülter y colaboradores (2013) publicaron la predicción de 1.090 operones en el genoma de *E. meliloti* (Schlüter *et al.* 2013). Sus predicciones coinciden con las de otras herramientas y bases de datos de predicción de operones bacterianos tales como Operome DB (<http://sysbio.informatics.iupui.edu/operomeDB/#/>) (Chetal y Janga 2015) y DOOR (<http://csbl.bmb.uga.edu/DOOR/>) (Mao *et al.* 2009). La utilización de estas herramientas para analizar la región predice (en todos los casos) que el RR SMc02366 formaría una unidad transcripcional independiente que incluiría tres genes: SMc02366, SMc02367 y SMc02368. Si bien Schülter y colaboradores (2013) han validado experimentalmente decenas de operones, este en particular aún no ha sido estudiado.

A su vez, en la región del cromosoma que contiene los genes mencionados, se han detectado ARNs antisentido pequeños (conocidos como asRNA, por sus siglas en inglés **Antisense-Small RNA**) (Figura 4.3). Los asRNAs de procariotas son transcriptos de 100 nucleótidos en promedio que regulan la expresión de proteínas al unirse por complementariedad de bases a mRNAs (del inglés **Messenger RNA**, ARN mensajero) (Georg y Hess 2011). Los asRNAs son importantes en la regulación postranscripcional de la expresión génica. Se ha descrito que, en ocasiones, la regulación de la expresión génica por asRNAs está asociada al control transcripcional que ejercen los TCS sobre otros asRNAs (Gopel y Gorke 2012). En el genoma de *E. meliloti* se han identificado cientos de asRNAs (Schlüter *et al.* 2013). Se encontró además que, algunos asRNAs, al igual que los TCS, están involucrados en mecanismos de

tolerancia a estrés (Duhring *et al.* 2006) pero su función biológica sigue siendo desconocida en la mayoría de los casos. En particular, las funciones de los asRNAs ubicados en la región estudiada (asRNA_1141/4) aún no se han reportado.

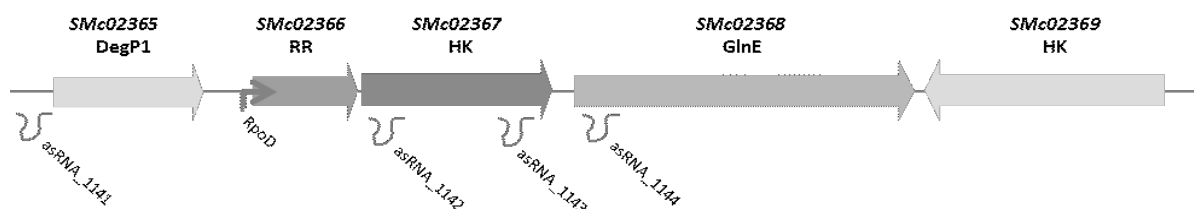


Figura 4. 3. Contexto genómico del RR SMC02366.

La figura esquematiza los genes, proteínas y asRNAs codificados en la región del cromosoma de *E. meliloti* 2011 que se encuentra el TCS SMC02366/SMC02367. Se indica además la posición de un promotor de tipo RpoD predicho por herramientas bioinformáticas en el comienzo del ORF del SMC02366.

Validación experimental de la unidad transcripcional

La presencia de más de un ORF en un único mRNA, típico de procariotas, permite identificar los genes principales de una función determinada. La localización y orientación de los genes en el genoma, las distancias intergénicas, la relación funcional, y la búsqueda de operones *in silico*, sugiere que SMC02366 podría formar parte de una unidad funcional policistónica. Nos propusimos entonces identificar qué genes se transcriben en un mismo mRNA.

Según se detalla en el Capítulo 2 (Sección 2.8), se realizó la extracción y purificación de ARN total de bacterias obtenidas de cultivos de *E. meliloti* 2011 en condiciones neutras (pH 7,0) o de estrés (pH 5,60) en fase de crecimiento exponencial. Se realizó la síntesis de ADNc empleando cebadores al azar y luego se lo utilizó como molde para identificar los genes que pertenecen a un mismo mRNA. Para ello se amplificaron regiones intergénicas por PCR.

Como se puede ver en la Figura 4.4, los ORFs que codifican para los posibles RR, HK y GlnE se transcriben en un mismo ARNm en ambas condiciones de pH ensayadas (pH=7,0 o pH=5,6) y dicho transcripto no contiene a *degP1* (Figura 4.4.B).

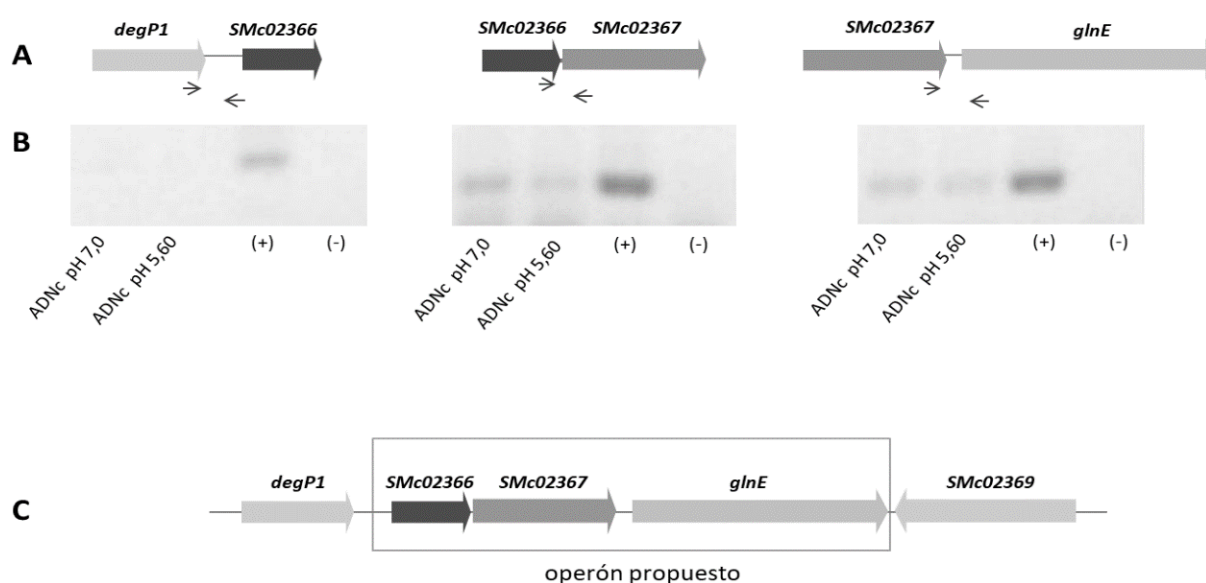


Figura 4. 4. Validación experimental de la estructura del operón que contiene al RR SMC02366.

A) Se indica la localización de los *primers* (flechas pequeñas) utilizados en este ensayo. Los *primers* hibridan en las regiones intergénicas de los genes del posible operón. **B)** Análisis en gel de agarosa de los productos de amplificación obtenidos por PCR al emplear los cebadores indicados en la parte A y diferentes moldes obtenidos de *E. meliloti* en las condiciones indicadas (los ADNc obtenidos a partir de ARNs que provenían de cultivos a pH=7,0 o pH=5,6). Los productos de amplificación fueron corridos en gel de agarosa 2% y visualizados por tinción con bromuro de etidio e iluminación con luz ultravioleta. (+) control positivo de la PCR; (-) control negativo de la PCR. **C)** Se indica el operón propuesto a partir de los resultados obtenidos.

4.2.5. Análisis de la relevancia de los genes que componen el operón en la tolerancia a acidez

Los estudios realizados hasta aquí sugieren que el gen que codifica para el RR (SMc02366), interviene en procesos de tolerancia a la acidez. El mutante RR⁻ utilizado para estos estudios, fue generado por la inserción de un plásmido en la región interna del gen por recombinación homóloga simple (Sección 4.2.1, Tabla 4.1). Considerando la naturaleza policistónica de la unidad transcripcional que detallamos en la sección anterior, es posible que la mutación en el RR presente en la cepa Eme RR⁻ tenga un carácter polar con pérdida de los otros componentes del operón. En este sentido, el fenotipo observado en la cepa Eme RR⁻ puede ser debido a la ausencia del RR SMC02366 y/o a la pobre o nula transcripción de los genes que codifican para la HK (SMc02367) o GlnE (SMc02368).

Con el objetivo de indagar el rol de cada elemento del operón en la tolerancia a la acidez, construimos mutantes por delección sin alterar el marco de lectura de cada gen (Capítulo 2, Sección 2.5). La posibilidad que el fenotipo de mayor sensibilidad a la acidez esté vinculado con la variación o pérdida de los niveles de transcripción de los asRNAs presentes en la porción de ADN que codifica para la HK SMC02367 (Figura 4.3), también fue tomada en cuenta. En consecuencia, también se generaron mutantes independientes que afecten o dejen intacto dichos asRNAs. La Tabla 4.2 resume las características más relevantes de los mutantes construidos.

Posteriormente, analizamos las curvas de crecimiento y compararon las μ de los mutantes con la cepa isogénica salvaje (Figura 4.5). Los resultados mostraron que la ausencia individual o simultánea del RR y la HK resultan en una disminución similar de la velocidad de crecimiento, indicando que los productos de expresión de este posible TCS juegan un rol relevante en la tolerancia a la acidez. Además, se pudo evidenciar que GlnE y los asRNAs localizados en el ORF de la HK (asRNA_1142 y asRNA_1143) no intervendrían en el proceso de adaptación/tolerancia a la acidez.

Con el objetivo de confirmar que los componentes del sistema RR SMC02366 - HK SMC02367 son los responsables del fenotipo observado, procedimos a realizar una complementación funcional de dichos mutantes. Para ello se llevó a cabo una conjugación biparental entre los mutantes de delección de *E. meliloti* y *E. coli* S17-1 portadora de un plásmido replicativo de mediano número de copias en *E. meliloti* (pSRKGm) (Khan *et al.* 2008) en el que se clonaron individualmente las secuencias codificantes para el RR y la HK silvestres. Paralelamente, como controles, realizamos conjugaciones de las cepas mutantes con una variante de *E. coli* S17-1 portadora del plásmido de expresión vacío.

Por último, analizamos las curvas de crecimiento en medio GS a pH 5,60 de las cepas obtenidas. En la Figura 4.6 se muestran las μ correspondientes a las cepas analizadas. La comparación de los parámetros de crecimiento permitió observar que la expresión del RR SMC02366 o de la HK SMC02367 restaura el tiempo de duplicación exponencial de la cepa salvaje.

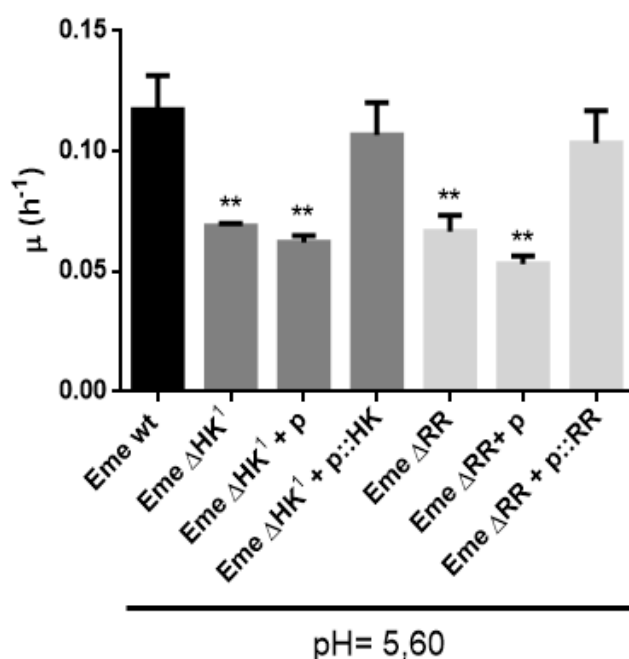


Figura 4. 5. Ensayo de complementación funcional de los mutantes Eme ΔRR y Eme ΔHK .

Se analizó la μ de cultivos bacterianos en medio GS a pH 5,60. Se evaluaron: Eme wt, Eme ΔRR , Eme ΔHK (ver Tabla 4.2); y la restauración de la función del RR y la HK (Eme $\Delta RR+p::RR$ y Eme $\Delta HK^1+p::HK$) realizadas por el clonado de sendos genes en el plásmido de expresión pSRKGm (Khan *et al.*, 2008). Como condición control se transformó el plásmido vacío en las cepas Eme ΔRR y Eme ΔHK^1 (Eme $\Delta RR+p$ y Eme ΔHK^1+p). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media ($\pm SD$) de tres experimentos independientes. El análisis estadístico corresponde a un análisis ANOVA con un $p < 0,05$ de las cepas comparadas frente a Eme wt.

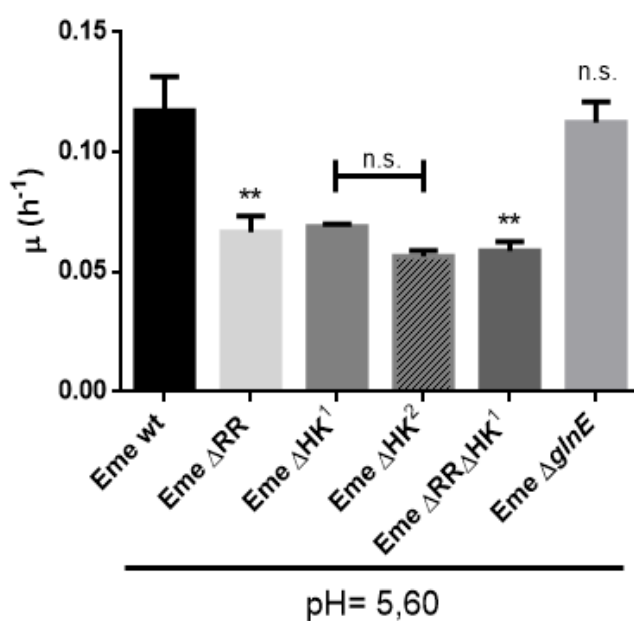


Figura 4. 6. Análisis de la velocidad máxima de crecimiento de las cepas mutantes en medio ácido.

Se analizó la μ de cultivos de Eme wt y los mutantes en los genes del operón que se indican en la Tabla 4.2. La gráfica muestra la media de valores μ de tres experimentos independientes con sus respectivas desviaciones estándar ($\pm SD$). El análisis estadístico corresponde a un análisis ANOVA con un $p < 0,05$. Al menos que se indique lo contrario, la comparación se realizó frente a Eme wt.

Tabla 4. 2. Listado de los mutantes generados mediante delecciones “limpias” de los elementos del operon.

Nomeclatura	Elementos delecionados	Tamaño de la proteína truncada (aminoácidos)	Delección (aminoácidos)	Elementos salvajes de la región genómica
Eme Δ RR	SMc02366	117	56-177	SMc02367, SMc02368, <i>asRNA_1142</i> , <i>asRNA_1143</i>
Eme Δ HK ¹	SMc02367, <i>asRNA_1143</i>	210	120-381	SMc02366, SMc02368, <i>asRNA_1142</i>
Eme Δ HK ²	SMc02367	263	173-381	SMc02366, SMc02368, <i>asRNA_1142</i> , <i>asRNA_1143</i>
Eme Δ RR Δ HK ¹	SMc02366, SMc02367, <i>asRNA_1143</i>	117; 210	56-177; 120-381	SMc02368, <i>asRNA_1142</i>
Eme Δ glnE	SMc02368	283	136-845	SMc02366, SMc02367, <i>asRNA_1142</i> , <i>asRNA_1143</i>

4.2.6. Rol del regulador SMc02366 en la respuesta de tolerancia a la acidez

La llamada Respuesta de Tolerancia a la Acidez (ATR, del inglés ***Acid Tolerance Response***) (Foster y Hall 1990) que se observa en algunas bacterias, involucra cambios en la fisiología bacteriana que resulta en un fenotipo de mayor tolerancia a condiciones ácidas severas cuando estos organismos han estado expuestos previamente a un ambiente de acidez moderada. Esa respuesta requiere de la síntesis proteica (Foster y Hall 1990, 1991). Cabe destacar que en rizobios se ha observado la presencia de una ATR. En particular, los ensayos reportados en *E. meliloti* 2011 utilizan medio mínimo Evans (Evans 1970), pH=6,1 como condición de acidez moderada, pH=4,0 como condición de desafío y pH=7,0 como condición neutra (Draghi *et al.* 2010). Utilizando las mismas condiciones (que previamente han sido reportadas por nuestro grupo) nos propusimos explorar el posible vínculo del RR estudiado con la respuesta ATR.

Cultivos de Eme wt o Eme Δ RR que provenían de medio Evans a pH=7,0, no manifestaron diferencias significativas en sus tiempos de reducción decimal (D_{10} , tiempo requerido para que se reduzca el número de células en un factor de 10) al desafiarlas al *shock* ácido (pH=4,0) (Figura 4.7A). En cambio, el mismo ensayo realizado con cultivos provenían de cultivos Evans a pH= 6,1 mostró una diferencia significativa entre los D_{10} de ambas cepas (Figura

4.7B). Estos resultados indican que Eme RR pierde la respuesta ATR, sugiriendo que el RR SMc02366 estaría involucrado en este tipo de mecanismo de adaptación a la acidez.

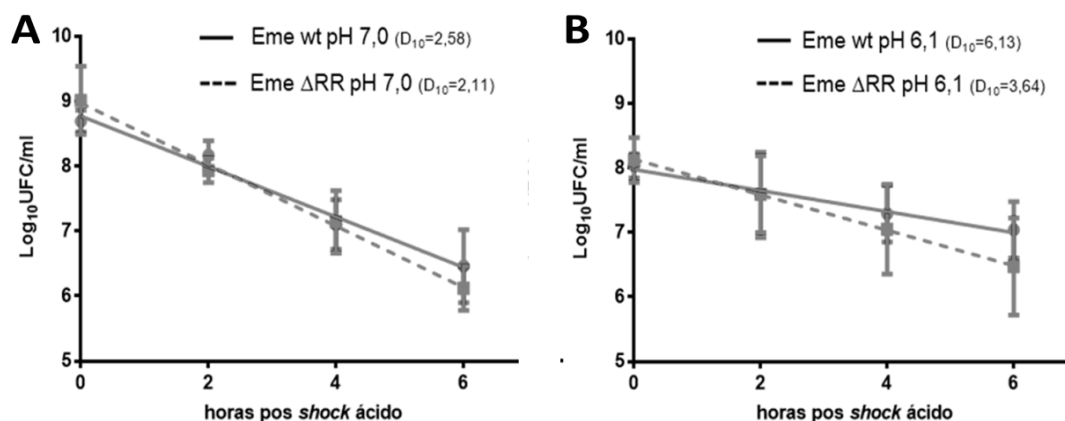


Figura 4. 7. Evaluación de la respuesta adaptativa de tolerancia a la acidez en cultivos de Eme wt y Eme Δ RR.

Los gráficos muestran la cinética de muerte de *E. meliloti* frente a un choque ácido severo a pH=4,0. Se realizaron recuentos de células viables (UFC/ml) de Eme wt o Eme Δ RR, previamente cultivadas a pH 7,0 (A) o pH 6,1 (B), en función del tiempo luego que se las desafió a una condición de pH 4,0 (*shock* ácido). El tiempo de reducción decimal (D_{10}) de las curvas son iguales con un $p=0,10$ (A) o distintas con un $p=0,0005$ (B). Los coeficientes de determinación (R^2) de las regresiones lineales fueron 0,98; 0,98; 0,99; 0,99 para Eme wt pH=7,0, Eme Δ RR pH=7,0, Eme wt pH=6,1, Eme Δ RR pH=6,1, respectivamente.

4.2.7. Análisis *in silico* del TCS SMc02366/SMc02367

Dada la relevancia del TCS SMc02366/SMc02367 en la tolerancia a la acidez en *E. meliloti* 2011 nos propusimos utilizar herramientas bioinformáticas para avanzar en la caracterización de este TCS.

Arquitectura de las proteínas RR SMc02366 y HK SMc02367

El RR SMc02366 es un posible RR de 233 aminoácidos, presente en una única copia en el cromosoma de este rizobio. Según la clasificación propuesta en el Capítulo 3 (Sección 3.2.2), está clasificado dentro del grupo OmpR. Contiene un dominio REC receptor donde ocurre la señalización por fosforilación y un dominio TransReg_c con función de unión a ADN. Probablemente, entonces, estemos en presencia de un regulador cuya función principal esté

relacionada con la interacción en promotores de genes específicos para modular su transcripción.

La HK SMC02367 localizada inmediatamente corriente abajo, por su parte, es una proteína de 465 aminoácidos, codificada en una copia única en el cromosoma, que se ancla en la membrana. Sus dos RTM flanquean una zona que protruye hacia el periplasma. En la región citoplasmática distinguimos dominios típicos HAMP, HisK_A y HATPasa_c. Ante la ausencia de dominios PAS, no hay indicios de una posible región de la proteína donde ocurra la detección de la señal. Para esta HK la región encargada de sensor una señal podría estar tanto en la región periplásmica como en la citoplasmática, en el caso que esta quinasa tenga una función relacionada con detectar situaciones extra o intracelulares respectivamente.

En la Figura 4.8 y Figura 4.9 mostramos los dominios conservados predichos en ambas proteínas utilizando el servidor *on line* SMART.

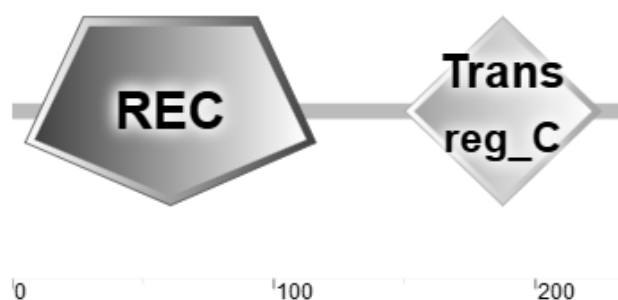


Figura 4. 9. Esquema de los dominios conservados predichos en el RR SMC02366.

Los métodos *in silico* identifican los dominios receptor REC y de unión a ADN TransReg_C. La representación de esta proteína se realizó mediante el servidor en línea SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1#). La escala en la figura hace relación a los aminoácidos de la proteína.



Figura 4. 8. Esquema de los dominios conservados predichos en la HK SMC02367.

En negro se muestran las regiones transmembrana. Se distinguen también los dominios HAMP, HisKA y HATPasa_c de localización citosólica. La representación de esta proteína se realizó mediante el servidor en línea SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1#). La escala en la figura hace relación a los aminoácidos de la proteína.

Búsqueda de sistemas homólogos al TCS SMc02366/SMc02367

Una estrategia muy utilizada para caracterizar funcionalmente sistemas de este tipo es explorar las posibles funciones compartidas en sistemas homólogos ya caracterizados de otros organismos. En este contexto, se emplearon herramientas *in silico* para la búsqueda de TCS homólogos como parte del estudio funcional del TCS SMc02366/SMc02367 de *E. meliloti*.

En una primera etapa, se realizó una búsqueda de proteínas homólogas con el motor de búsqueda BLASTP. Dentro del grupo Rhizobiaceae, el análisis indicó un alto grado de similitud a nivel de secuencia con un regulador transcripcional no caracterizado de la familia PhoB (91% de identidad) y con una HK que constituye un sensor de cobre/cinc (Cu/Zn) no caracterizado (69% de identidad).

Por fuera del grupo Rhizobiaceae, identidades más bajas asociaron las proteínas RR SMc02366 y HK SMc02367 con el TCS CusR/CusS de *E. coli* (44% y 29% de identidad respectivamente) que participa en la regulación de la homeostasis de Cu^{+2} (Gudipaty *et al.* 2012), y con el sistema de dos componentes PmrA/PmrB de *Salmonella enterica* (39% y 26% de identidad respectivamente) y de *Erwinia caratovora* (38% de identidad para el RR y 24% para la HK). Ambos sistemas están descritos como relevantes en la tolerancia al péptido antimicrobiano polymixina B, y sensan H^+ y Fe^{+3} (Hyytiäinen *et al.* 2003; Wösten *et al.* 2000).

En una segunda etapa, realizamos un análisis genómico comparativo a fin de evaluar el grado de conservación de la región génica en torno al RR SMc02366 utilizando la herramienta bioinformática SyntTax (<http://archaea.u-psud.fr/synttax/About.aspx>) (Oberto 2013). Se compararon genomas de cepas de la misma especie, de especies filogenéticamente cercanas (otros rizobios) y otros géneros bacterianos evolutivamente más alejados. La localización y orientación de los genes presentes mostraron una remarcable sintonía con los genes ortólogos hallados en otros genomas de la familia Rhizobiaceae (Figura 4.10).

Finalmente, nos propusimos utilizar diversas herramientas con el objetivo de modelar las proteínas. Nuestro objetivo fue utilizar tanto el método de predicción de estructuras “*ab initio*” como el “*homology model*” para producir los modelos tridimensionales de estas proteínas cuya función es desconocida. Valiéndonos de esos modelos, podremos buscar en

las bases de datos de estructuras de proteínas para determinar si son similares a proteínas de la función conocida. A partir de esta semejanza se podrían realizar inferencias funcionales sobre el rol biológico de estas proteínas. La posibilidad de contar con una predicción de la disposición espacial de los átomos del RR SMC02366 y la HK SMC02367 nos podría permitir además de avanzar en el estudio de sus funciones moleculares, estudiar su historia evolutiva o, si el modelo es bueno, diseñar/muestrear ligandos e incluso calcular sus afinidades (Singh y Dominy 2010). En este contexto, realizamos una búsqueda de proteínas homólogas mediante la comparación de las estructuras terciarias del RR y de la HK con bases de datos de proteínas cristalizadas utilizando los programas *on line* Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>), RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/>) y SwissModel (<https://swissmodel.expasy.org/>).

Los resultados de los tres servidores indicaron un alto grado de homología del RR con la proteína PrrA del TCS PrrA/PrrB de *M. tuberculosis*. Este sistema es importante para la supervivencia de la bacteria en macrófagos y además se activa en condiciones limitantes de nitrógeno (Haydel *et al.* 2012). Con respecto a la HK SMC02367 estudiada, la búsqueda de homólogos por modelado proteico encontró cierta homología con CovS de *Streptococcus mutans* (20% de identidad). En esta bacteria Gram positiva, la HK CovS posee función regulatoria sobre una gran variedad de genes, incluyendo los responsables de la supervivencia a estrés ácido, estrés por temperatura y estrés salino (Dalton y Scott 2004). En la Tabla 4.3 se resume la información acerca de las proteínas homólogas encontradas por herramientas bioinformáticas.

El grado de conservación evolutivo de nuestro TCS con los sistemas caracterizados CusRS de *E. coli* y PmrAB de *S. enterica* y de *E. carotovora*, plantea el interrogante acerca de cuáles pueden ser las funciones compartidas entre nuestro sistema de estudio y los TCS mencionados. El sistema CusRS de *E. coli* es uno de los tres sistemas conocidos a la fecha que intervienen activamente en la tolerancia al exceso Cu^+ (Munson *et al.* 2000). Este sistema está compuesto por el operón *cusCFBA* cuya transcripción es regulada por el TCS CusR/CusS (Munson *et al.* 2000).

El sistema PmrAB de *S. enterica* regula la expresión de genes relacionados con la modificación de la composición de los lipopolisacáridos (LPS) de membrana aumentando, como consecuencia, su resistencia a péptidos antimicrobianos como polimixina B (Gunn *et*

al. 1998; Lee *et al.* 2004; Zhou *et al.* 2001). La resistencia que adquiere la bacteria está relacionada con una menor interacción de los LPS con la polimixina B, producto de un cambio de la carga electrostática de los LPS generado por modificaciones covalentes (Zhou *et al.* 2001). Está descrito que este sistema se activa de manera directa por Fe(III), Al(III) (Wösten *et al.* 2000) y ante una acidez moderada (Perez y Groisman 2007); y de manera indirecta por la disminución de la concentración de Mg^{+2} vía el sistema PhoP/PhoQ (García Vescovi *et al.* 1996). En este contexto, en las secciones siguientes detallaremos los resultados obtenidos al evaluar los mutantes del TCS en ensayos de tolerancia de Cu^{+2} , Fe^{+3} , Al^{+3} y polimixina B que realizamos para dilucidar si el TCS SMC02366/SMC02367 comparte similitudes funcionales con los sistemas CusR/CusS y PmrA/PmrB.

Tabla 4. 3. Predicción de homología/estructura utilizando métodos computacionales.

La tabla muestra los sistemas homólogos al TCS **SMC02366/SMC02367**. El porcentaje de identidad de la herramienta BLASTP se obtiene a partir del alineamiento de la estructura primaria de proteínas. Los programas Phyre2, RaptorX y SwissModel buscan proteínas homólogas comparando estructuras tridimensionales. Para ello, en primera instancia realizan un modelado de la proteína.

Sistema homólogo a SMC02366/SMC02367	Organismo	Nivel de homología según el programa utilizado			
		BLASTP	Phyre2 ^{*a}	RaptorX ^{*b}	Swiss Model ^{*c}
CusRS	<i>E. coli</i>	44% (RR) y 29% (HK)	-	-	-
PmrAB	<i>E. carotovora</i>	38% (RR) y 24% (HK)	38% (RR)	-	-
PmrAB	<i>S. enterica</i>	39% (RR) y 26% (HK)	-	-	-
PrrAB	<i>M. tuberculosis</i>	-	42% (RR)	valor $p= 2,52.10^{-6}$ (RR)	41% (RR)
CovS	<i>S. mutans</i>	-	-	valor $p= 2,65.10^{-4}$ (HK)	20,3% (HK)

Referencias:

***)** Métodos computacionales para la predicción de estructuras.

a) %: Confianza del modelo. No se recomienda considerar modelos con un valor de confianza <90%

b) p =valor de confianza. El valor p es la probabilidad de que un modelo predicho sea peor que el mejor de un conjunto de modelos generados aleatoriamente para esta proteína (o dominio), por lo que el valor p evalúa la calidad relativa de un modelo. Cuanto menor es el valor p , mayor es la calidad del modelo. Para las proteínas principalmente alfa, el valor p de menos de 10^{-3} es un buen indicador. Para las proteínas beta, el valor de p inferior a 10^{-4} es un buen indicador

c) %= GMQE, estimación global de la calidad del modelo. Es una estimación de la confiabilidad de la calidad que combina propiedades de la alineación proteína blanco-modelo y el método de búsqueda del modelo. La puntuación GMQE refleja la precisión esperada de un modelo creado con dicha alineación y modelo. Números más altos indican una mayor fiabilidad.

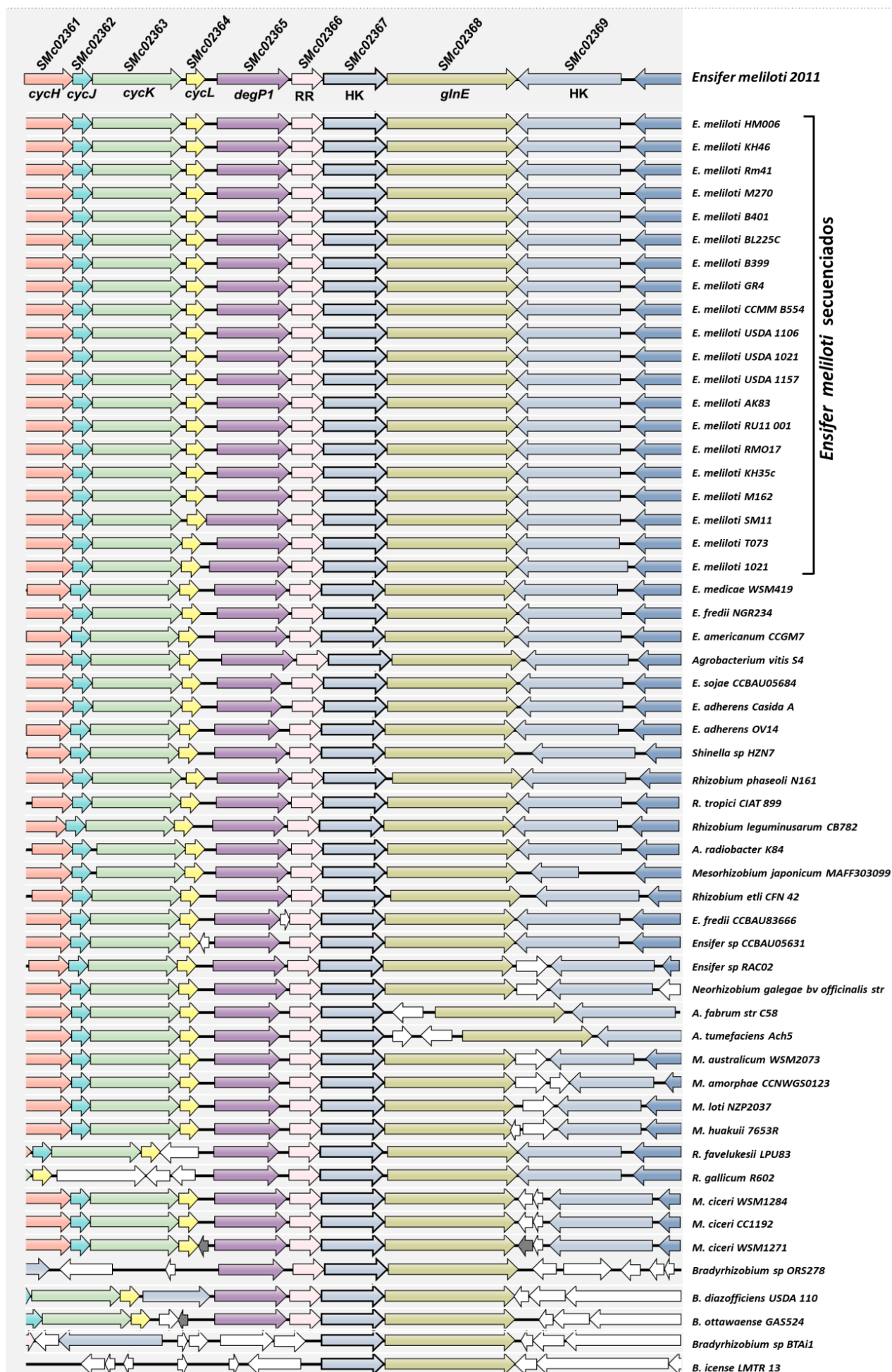


Figura 4. 10. Análisis genómico comparativo de la región que contiene a SMc02366 de *E. meliloti* 2011. En la porción superior de la figura se detallan los genes (flechas)/locus tag de *E. meliloti* 2011. Se utilizó un código de colores para indicar genes homólogos predichos en otros genomas.

Rol del TCS SMC02366/SMC02367 en la tolerancia a metales de transición

Con el objetivo de analizar el grado de conservación funcional del de *E. meliloti* con el sistema CusR/CusS de *E. coli*, evaluamos la capacidad de los mutantes del TCS SMC02366/SMC02367 de crecer en condiciones de alta concentración de cobre. En primera instancia analizamos el comportamiento de la cepa salvaje de *E. meliloti* 2011 frente a distintas concentraciones de $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{+2}) en GS (medio definido) y TY (medio rico) a fin de establecer una condición/concentración subletal para ensayar. Dichos ensayos permitieron elegir concentraciones de Cu^{+2} de 2 mM y 700 μM para usar en medio TY líquido y medio TY sólido respectivamente, mientras que el medio GS se descartó para los estudios por la falta de reproducibilidad de los datos. En las Figuras 4.11 y 4.12 puede observarse que los mutantes en los genes del TCS SMC02366/SMC02367 están afectados en el crecimiento en presencia de Cu^{+2} .

Estos ensayos nos permiten evidenciar que el TCS que estudiamos estaría siendo partícipe de alguna vía metabólica involucrada en la tolerancia a cobre extracelular/intracelular, aunque son insuficientes para poner de manifiesto cuáles son los procesos o estructuras celulares implicadas.

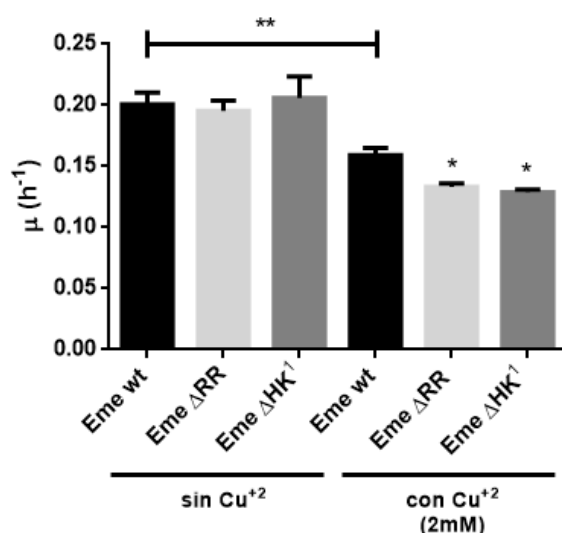


Figura 4. 11. Análisis de la velocidad máxima de crecimiento de las cepas mutantes en medio GS con y sin el agregado de 2mM Cu^{+2} .

La gráfica muestra las μ de las cepas salvaje (Eme wt) y las cepas mutantes en el RR (Eme Δ RR) y la HK (Eme Δ HK¹) cultivadas en medio rico TY suplementado con 2mM de CuSO_4 . Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media (\pm SD) de tres experimentos independientes. El análisis estadístico corresponde a un análisis ANOVA comparando Eme wt con Eme Δ RR y Eme Δ HK¹; o lo indicado en el gráfico. * $p < 0,1$; ** $p < 0,05$.

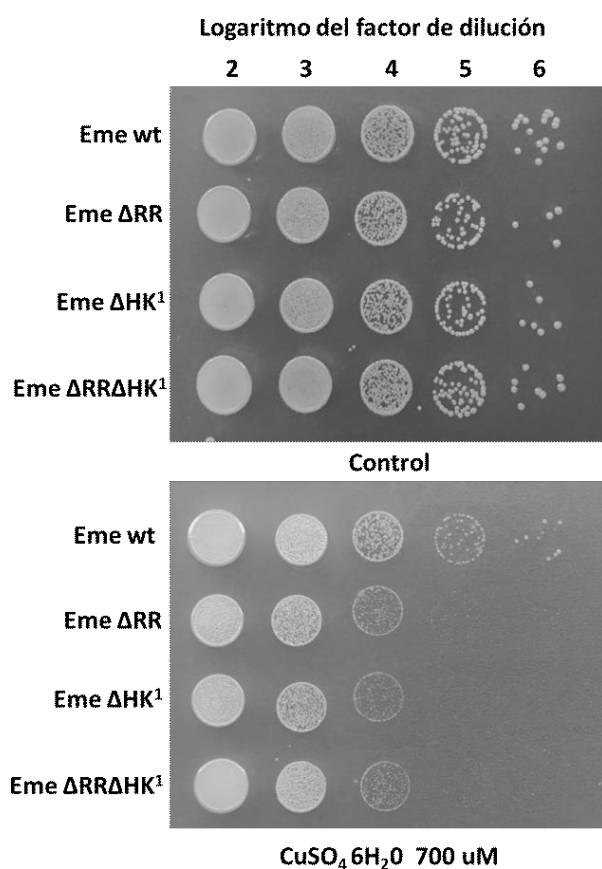


Figura 4. 12. Capacidad de mutantes derivados de *E. meliloti* 2011 para crecer en TY agarizado con altas concentraciones de cobre (II).

Los ensayos de tolerancia a $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (700 μM) se realizaron en placas de medio TY agarizado. En cada fila, las gotas son el resultado de diluciones seriadas 1/10 de cultivos en medio TY líquido normalizados a una misma densidad óptica. Como criterio control, las mismas diluciones se plaquearon en medio TY sin el agregado de la sal del metal (control). Eme wt: *E. meliloti* 2011 salvaje; en la Tabla 4.2 se detallan las características de los mutantes ensayados. Se muestra un ejemplo representativo de al menos tres experimentos. Las fotos fueron tomadas después 6 a 8 días de incubación a 28°C.

PmrA/PmrB de *S. enterica*, por su parte, responde a altas concentraciones de Fe(III) y Al(III) en el espacio periplásmico. Se ha descrito que la capacidad que posee la región sensora de PmrB de unir Fe^{+3} y Al^{+3} se debe a la presencia de dos motivos de unión a Fe, conocidas como ExxE, que son típicos de transportadores de este metal en otros organismos (Ramanan y Wang 2000; Stearman *et al.* 1996). Aunque los motivos ExxE están ausentes en la región sensora de SMC02367 en *E. meliloti* (Figura 4.13), nos propusimos evaluar el grado de conservación funcional de este sistema con el TCS PmrA/PmrB de enterobacterias.

Para ello evaluamos el comportamiento de los mutantes al desafiarlos a altas concentraciones de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 M) y $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2 mM). Ambas concentraciones se eligieron como situaciones de estrés subletal luego de realizar varios ensayos en un amplio rango de concentración de dichas sales. En la Figura 4.14 se observa que el sistema intervendría en procesos de tolerancia a altas concentraciones de Fe^{+3} y en menor medida a Al^{+3} , ya que se evidencia un menor crecimiento de las colonias en los medios suplementados

con estos metales. Por lo expuesto, proponemos que el sistema TCS SMc02366/SMc02367 de *E. meliloti* compartiría cierta homología funcional con PmrA/PmrB de *S. enterica*.

<i>S. enterica</i>	WHESTEQIQLF EQALRDNRNNDRHIMHEIRE
<i>E. coli</i>	WHESTEQIQLF EQALRDNRNNDRHIMREIRE
<i>K. pneumoniae</i>	WHE SKEQIQLLVASAIEGHNNQKHVEHEVRE
<i>Y. pestis</i>	WHE S QEQISFLVDETL SAKARNEQVDKEIAE
<i>E. meliloti</i>	RHVALAQVLVLDNGLRILVGRDLQEPEKFRV

Figura 4. 13. Aminoácidos conservados en la región sensora de HKs ortólogas a SMc02367.

Resaltado en negro se muestra el motivo ExxE de unión a hierro presentes en las regiones sensoras de PmrB ortólogas (*Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia pestis*)

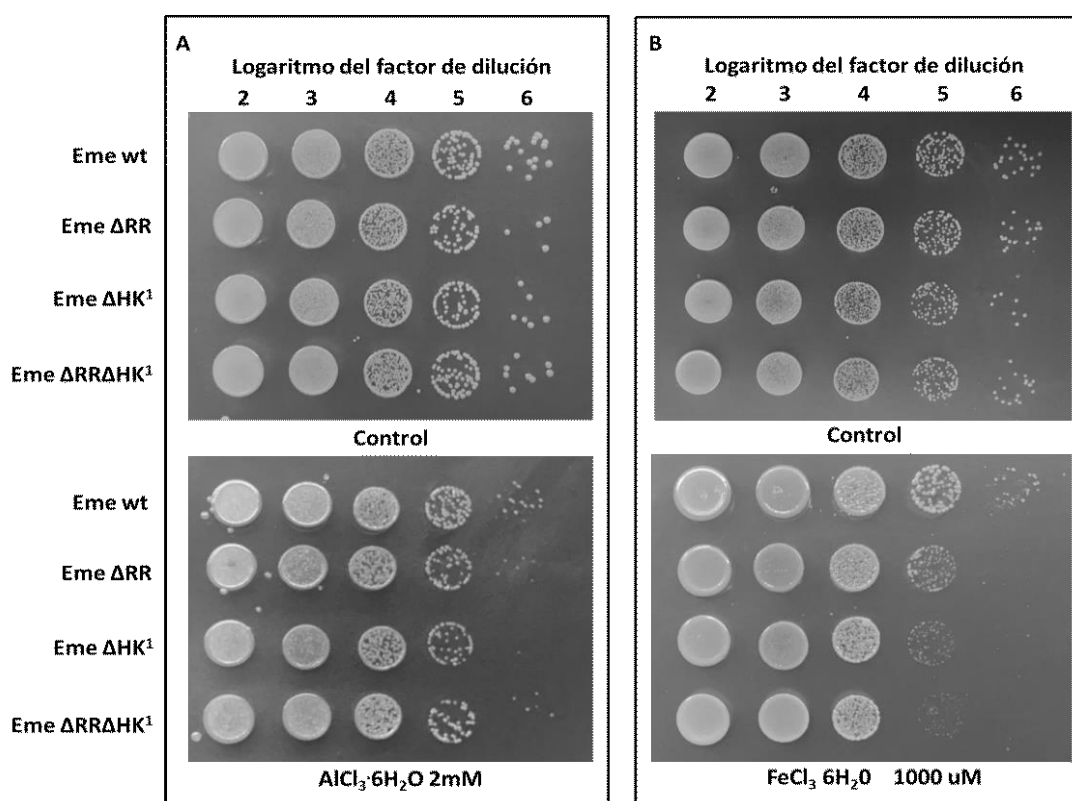


Figura 4. 14. Capacidad de mutantes derivados de *E. meliloti* 2011 para crecer en TY agarizado con altas concentraciones de hierro(III) y aluminio (III).

Los ensayos de tolerancia a $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2mM) (A) y $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1000 μM) (B) se realizaron en placas con medio TY agarizado. En cada fila, las gotas son el resultado de diluciones seriadas 1/10 de cultivos en medio TY líquido normalizados a una misma densidad óptica. Como criterio control, las mismas diluciones se plaquearon en medio TY sin el agregado de la sal del metal (control). Eme wt: *E. meliloti* 2011 salvaje; en la Tabla 4.2 se detallan las características de los mutantes ensayados. Se muestra un ejemplo representativo de al menos tres experimentos. Las fotos fueron tomadas después 6 a 8 días de incubación a 28°C.

Rol del TCS SMc02366/SMc02367 en la modificación de los LPS de membrana

El gen *pmrA* fue identificado en *S. enterica* en estudios de búsqueda de mutantes resistentes a polimixina B (de ahí su acrónimo *polymyxin resistance A*) (Helena Mäkelä *et al.* 1978). Los LPS aislados de estos mutantes se unen con menor intensidad a la polimixina en comparación a los LPS aislados de cepas salvajes, sugiriendo que este *locus* media la resistencia a estos péptidos antimicrobianos al modificar las propiedades de los LPS (Vaara *et al.* 1981). La modificación covalente de estos lípidos regulada por el sistema PmrA/PmrB, puede ocurrir a nivel del lípido A (Lee *et al.* 2004; Zhou *et al.* 2001), del *core* (Tamayo *et al.* 2005) y del antígeno-O (Delgado *et al.* 2006; Holzer *et al.* 2009); y en todos los casos resulta en un cambio de la carga neta del LPS y la consecuente modificación de las uniones electrostáticas entre el LPS y las moléculas de polimixina.

Con el fin de evaluar la posibilidad que exista una concordancia funcional entre el RR SMc02366 de *E. meliloti* y su homólogo PmrA de *S. enterica* en términos del comportamiento frente a polimixina B, realizamos un estudio de tolerancia a este péptido. Observamos que la ausencia del RR SMc02366 no altera la tolerancia a la polimixina B en comparación con la cepa parental (Figura 4.15).

Además, en *S. entérica* el TCS PmrA-PmrB, regula principalmente genes que participan en las modificaciones de la estructura de los LPS (Delgado *et al.* 2006). Los LPS constituyen un componente ubicuo de la membrana externa de bacterias Gram negativas. Dada la diversidad estructural que este polisacárido presenta entre bacterias de diferentes especies, y aún entre cepas de una misma especie, el análisis electroforético en SDS-PAGE de los LPS ha sido muy utilizado para la caracterización y quimio-tipificación de cepas bacterianas. (Prieto *et al.* 2000). En particular, los cambios producidos en las unidades repetitivas del antígeno-O pueden ponerse de manifiesto en geles de poliacrilamida (Komaniecka *et al.* 2016).

En el marco de estas observaciones, analizamos los perfiles de LPS de membrana externa de las cepas Eme wt y mutantes en los genes que componen el operón SMc02366/8 (Eme Δ RR, Eme Δ HK¹, Eme Δ glnE) en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), con el fin de evaluar si SMc02366 afecta la expresión de genes cuyos productos impacten en la polimerización del antígeno-O o en otros aspectos estructurales de los LPS. Las muestras de LPS fueron preparadas por extracción de las bacterias con EDTA-trietilamina, y luego purificadas por

afinidad con polimixina B (Capítulo 2, Sección 2.9). Las bandas de mayor movilidad correspondieron a aquellas especies de LPS que sólo poseen lípido A-core (R-LPS, *rough*-LPS), mientras que las bandas de menor movilidad correspondieron a las especies de LPS que poseen además una cadena de antígeno-O unida al lípido A-core (S-LPS, *smooth*-LPS). Las cepas mutantes presentaron todas un mismo patrón electroforético caracterizado por la presencia de una banda única de S-LPS, como la de Eme wt y resultaron indistinguibles (no mostrado).

Estos resultados indican que el TCS predicho (SMc02366-SMc02367) no participaría en la regulación de la expresión de genes responsables de modificar la carga electrostática o alterar la cantidad de antígeno-O presente en los LPS en *E. meliloti*.

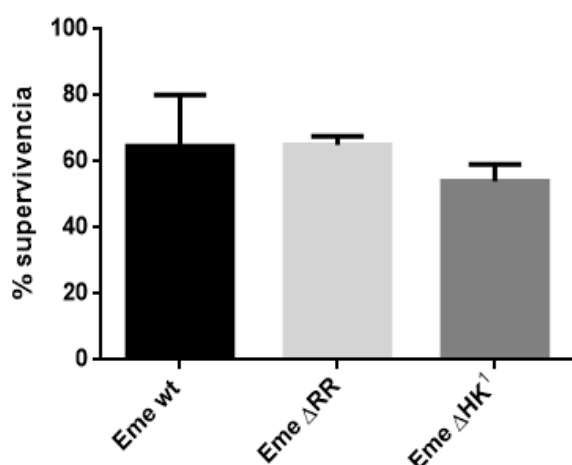


Figura 4. 15. Tolerancia a polimixina B de los mutantes del TCS SMc02366/SMc02367 derivados de *E. meliloti* 2011.

El ensayo de tolerancia a polimixina B consistió en registrar el recuento de células sobrevivientes al desafío de polimixina B (20 μ g/ml) luego de una incubación de tres horas. El valor graficado (% supervivencia) se obtiene de normalizar los valores al registro de células supervivientes sin el agregado de polimixina B (resuspendidas en solución fisiológica 0,9%). Los datos corresponden al promedio de tres ensayos independientes con la desviación estándar de la media (\pm SD). El análisis estadístico corresponde a un estudio ANOVA con valor $p < 0,1$.

4.3. Conclusiones

En este capítulo se dio inicio al abordaje de la construcción de una colección de cepas mutantes en RRs isogénicas a *E. meliloti* 2011. Gracias a una colaboración con la Dra. Becker y a través del empleo de herramientas moleculares, se logró contar con 37 mutantes generados por la inserción de un plásmido o de un transposón (*Tn5*) en una región interna del gen.

En una segunda etapa, hemos identificado dentro de dicha colección al RR SMc02366 como relevante para la tolerancia de *E. meliloti* a la acidez. Además para este regulador validamos experimentalmente su ubicación dentro de un operón, que también codifica para una quinasa SMc02367 y GlnE. Se caracterizó el rol de estos genes en condiciones de crecimiento planctónico en acidez, y se encontró que la HK SMc02367 también es requerida para mantener la capacidad de la bacteria de crecer en acidez. Se construyeron cepas mutantes complementadas donde la expresión constitutiva del RR y la HK verificaron el rol de los mismos restaurando el fenotipo de la cepa salvaje.

Posteriormente, se encontró que estas proteínas comparten, parcialmente, funciones que han sido descritas en sistemas homólogos. El TCS de *E. meliloti* estaría involucrado en procesos de tolerancia a cobre al igual que el TCS homólogo CusR/CusS, presente en *E. coli*; y en procesos de tolerancia a hierro y aluminio, como el TCS homólogo PmrA/PmrB de *S. enterica*. Esta última observación resultó sorprendente ya que el motivo ExxE involucrado en la unión a hierro y aluminio de la región sensora de PmrB está ausente en la HK SMc02367.

Dado que la tolerancia de los mutantes a la polimixina B y la estructura de los LPS no resultaron distinguibles de los de la cepa salvaje, un rol en la regulación de genes asociados a la modificación covalente de LPS bacterianos como ha sido descrito para ciertas enterobacterias no estaría presente en *E. meliloti*.

Los mutantes presentados en este capítulo nos permitirán explorar en los capítulos siguientes el regulón molecular asociado al TCS predicho SMc02366/SMc02367. Posiblemente darán lugar al hallazgo de determinantes que sugieran los procesos biológicos de *E. meliloti* en los que participa y/o regula tanto durante la vida libre como durante la asociación simbiótica con alfalfa.

Utilización de herramientas
proteómicas para la búsqueda y
caracterización de marcadores
moleculares afectados por
SMc02366 en *Ensifer meliloti*
cultivado a pH ácido

Capítulo 5

5.1. Introducción

La ácido tolerancia de los rizobios ha sido considerada como una característica fenotípica que influye positivamente en el establecimiento de la simbiosis en condiciones de acidez (Howieson y Ewing 1986). Una de las estrategias experimentales que inicialmente ha sido empleada para corregir las deficiencias de las asociaciones rizobio-leguminosa en condiciones de acidez, fue la de intentar el mejoramiento de las características simbióticas de cepas que naturalmente son ácido tolerantes (Richardson y Simpson 1989). Dicha aproximación se contrapone a la opción de buscar el mejoramiento de la ácido tolerancia de cepas infectivas y eficientes en la FBN en suelos a bajo pH (Glenn y Dilworth 1994). La primera estrategia está basada en el mejor conocimiento genético y bioquímico del funcionamiento de los genes simbióticos (*nod-nif-fix*) que el de los genes que determinan la ácido tolerancia de los rizobios. Sin embargo es muy posible que los aumentos de la ácido tolerancia conseguidos por métodos recombinantes permitan aumentar la supervivencia y el desenvolvimiento simbiótico de los rizobios a bajo pH, en particular de *E. meliloti* que, como hemos discutido en la introducción de esta tesis, es muy poco tolerante a la acidez.

En este contexto, la identificación de determinantes genéticos de tolerancia a la acidez en *E. meliloti* ha sido considerada un punto importante hacia el diseño y generación de bacterias recombinantes que tengan mayor persistencia y actividad simbiótica a bajo pH. Sin embargo, se ha puesto en evidencia un panorama complejo que requiere de mayor conocimiento básico para avanzar en la comprensión de los mecanismos que emplea la bacteria para resguardarse de la acidez del medio. Existen algunos genes de *E. meliloti* que han sido identificados como marcadores de tolerancia a la acidez (genes *act*), cuya mutagénesis conduce a fenotipos bacterianos más sensibles a las condiciones de bajo pH en condiciones de laboratorio (Tiwari *et al.* 1996, Reeve *et al.* 1997, Reeve *et al.* 1998, Glenn *et al.* 1999). Además, ensayos transcriptómicos (Hellweg *et al.* 2009), proteómicos y metabolómicos (Draghi *et al.* 2016) han aportado evidencia que indica que la tolerancia a la acidez en *E. meliloti* es un fenotipo multigénico, donde los genes/proteínas/metabolitos participantes que han sido identificados corresponden a moléculas asociadas posiblemente a más de una función celular y no exclusivamente a determinar el perfil de ácido tolerancia de la bacteria. La manipulación racional de la tolerancia a la acidez para el mejoramiento de

cepas/inoculantes requerirá entonces de una mayor caracterización genética y funcional de los marcadores *act*.

Dado el carácter incipiente de nuestro conocimiento sobre los mecanismos fisiológicos que determinan las características centrales de tolerancia a la acidez en *E. meliloti* y con el objetivo de avanzar en la caracterización funcional del sistema SMc02366/SMc02367 predicho en *E. meliloti* y su relación con la tolerancia a estrés ácido, hemos llevado a cabo un abordaje de alcance ómico a través de la determinación de los cambios que suceden en el proteoma (este capítulo) y en el metaboloma (capítulo siguiente) de *E. meliloti* ante la ausencia de SMc02366. Se espera que la identificación y cuantificación diferencial de proteínas - de membrana y citosólicas – a partir de cultivos *batch* a pH ácido (5,6) de Eme wt y Eme Δ RR permita esclarecer, al menos en parte, los determinantes moleculares del rol fisiológico de SMc02366, inferir sus posibles puntos de control sobre la expresión génica y los fenotipos que derivan de su actividad.

5.2. Resultados y discusión

5.2.1. Análisis del perfil de expresión diferencial de proteínas obtenidas de cultivos de Eme Δ RR y Eme wt en condiciones ácidas

A partir cultivos *bacht* en medio mínimo GS a pH $5,60 \pm 0,03$ (condición subletal) de células de Eme wt o Eme Δ RR, obtuvimos las proteínas totales y posteriormente realizamos la separación de las mismas en fracciones citoplasmáticas y fracciones de membrana (ver Capítulo 2, Sección 2.10.1 y 2.10.2). La fase de crecimiento de los cultivos elegida para realizar la cosecha de las células correspondió a la zona de crecimiento exponencial ($DO_{600} = 0,5 \pm 0,05$) de ambos cultivos. Se eligió esta etapa debido a que: *i*) en esta zona se registra una diferencia significativa de la velocidad de crecimiento entre ambos, y *ii*) probablemente en esta etapa sea máxima la tasa de síntesis de proteínas destinadas a afrontar la condición de estrés. En consecuencia, este estadio representa un estado fisiológico de los rizobios interesante para avanzar en la comprensión de los mecanismos bioquímicos de base en los que SMC02366 esté implicado y en su posible relación con las respuestas de crecimiento, tolerancia, y adaptación de los rizobios en el medio ácido extracelular.

La Figura 5.1 esquematiza los pasos que realizamos para la identificación y cuantificación diferencial de proteínas. La electroforesis de geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Capítulo 2, sección 2.10.3) nos permitió evaluar la calidad de los extractos proteicos obtenidos. La identificación y cuantificación diferencial de proteínas fue realizada utilizando un espectrómetro de masa con analizador orbitrap acoplado a un nano-HPLC (LC/MS-MS) disponible en nuestro laboratorio como nodo del CEQUIBIEM (Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectroscopia de Masas) prestador de dicho servicio. Las proteínas fueron identificadas por el programa Proteome Discoverer (Thermo), normalizadas y visualizadas por el programa de libre acceso Perseus (<http://www.biochem.mpg.de/5111810/perseus>). La tecnología que posee el CEQUIBIEM permite separar las proteínas e identificarlas simultáneamente en el mismo equipo, permitiendo prescindir de la previa separación de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturizantes bidimensionales. Con este esquema de trabajo, el análisis identificó alrededor de **1500** proteínas en las tres réplicas biológicas para cada grupo de células, representando este número aproximadamente el 30% del total de proteínas predichas en el genoma de *E. meliloti*.

A partir de la información provista por el análisis por LC-MS/MS, centramos en análisis en dos grupos de proteínas: *i*) Proteínas de **Clase I**, correspondientes a proteínas **aumentadas** o **disminuidas** en la muestra Eme Δ RR al menos 2 veces - con respecto a Eme wt - y con un valor-p estadístico menor o igual a 0,05; y *ii*) proteínas de **Clase II**, **presentes** o **ausentes** en la muestra Eme Δ RR. En general, a proteínas que se manifiestan de esta manera se las denomina con el término *on* (prendida) u *off* (apagada). El programa Perseus permite visualizar la proporción de cambio (FC, **Fold Change**) y la significancia estadística (valor-p de un análisis *t*-student) de las proteínas denominadas de Clase I en un gráfico que se conoce como *volcano plot* o *scatter plot* (Figura 5.2). Las proteínas de los cuadrantes superiores (en rojo) corresponden a proteínas sobreexpresadas con un FC mayor a 2 (en el *eje x* del gráfico >1) o inhibidas con un FC menor a 2 (en el *eje x* del gráfico <-1). Ambos grupos poseen una significancia estadística de $p < 0,05$ (en el *eje y* del gráfico $>1,3$). Las proteínas de Clase II, por su parte, no se visualizan por un *scatter plot* debido a que estas proteínas no pueden ser analizadas estadísticamente. Para identificar proteínas de este grupo, fue necesario observar con detalle el comportamiento *on/off* en la lista de todas las proteínas identificadas.

De esta manera, asignamos **51** proteínas a la Clase I y **12** a la Clase II. Dentro de la Clase I encontramos 20 proteínas inhibidas (11 citosólicas y 9 de membrana) y 31 sobreexpresadas (20 citosólicas y 11 de membrana) (Tablas 5.1 y 5.2); mientras que dentro de la Clase II, 3 están *on* y 9 están *off* (Tabla 5.3).

Las Tablas 5.1-5.3 muestran además: identificación de las proteínas correspondiente a la asignada en la base de datos UniProt; los ORFs (*locus tag*) que las codifican; la proporción de cambio con respecto a Eme wt; la significancia estadística de un análisis univariado de las tres réplicas biológicas (valor-p); y una breve descripción del rol biológico propuesto.

Para comenzar con el análisis funcional de las mismas, realizamos una rápida clasificación de las proteínas agrupándolas según características funcionales comunes. Para este análisis, es frecuente agrupar las proteínas en grupos cuyos genes han evolucionado a partir de un ancestro común. Estos grupos de genes ortólogos (COG, **Cluster of Orthologous Groups of proteins**) (Tatusov *et al.* 1997; Tatusov *et al.* 2003), a los que se los asigna con una letra mayúscula, se los asignamos a las proteínas identificadas utilizando el servidor *on line* EggNOG (<http://eggnogdb.embl.de/#/app/home>). Las 63 proteínas de las Clases I y II fueron agrupadas en los siguientes grupos (Tablas 5.1-5.3): **M**, biogénesis de la membrana (13

miembros); **S**, función desconocida (9); **G**, metabolismo y transporte de carbohidratos (6); **P**, metabolismo y transporte de iones inorgánicos (5); **T**, mecanismo de traducción de señales (5); **E**, metabolismo y transporte de aminoácidos (4); **U**, transporte intracelular (2); **N**, movilidad (2); **J**, traducción de proteínas (2); **O**, recambio de proteínas y modificación postraduccional (3); **I**, metabolismo de lípidos (1); **V**, mecanismos de defensa (1); **F**, transporte y mecanismos de defensa (1); **L**, replicación y reparación del ADN (1); **D**, control del ciclo celular (1). Cinco proteínas no pudieron ser asignadas en ningún grupo (*n.a.*).

Con el objeto de ahondar aún más en la asignación funcional de las proteínas, utilizamos la base de datos KEEG (<http://www.genome.jp/kegg/>); el motor de búsqueda de proteínas homólogas BLASTP; y la bibliografía reportada, para ampliar la información de las proteínas de Clase I y Clase II que nos brindó inicialmente el programa Proteome Discoverer. Este análisis contribuyó a caracterizar el conjunto de funciones bioquímicas cuya actividad es regulada o afectada (directa o indirectamente) por SMc02366. Para cada uno de los marcadores se realizaron entonces búsquedas de similitud de secuencia con dominios y/o proteínas de función conocida. Se presenta a continuación una breve descripción de las funciones asignadas *in silico* y del estado del arte de los trabajos relacionados reportados en bacterias en general y en rizobios en particular.

Antes de comenzar a discutir los resultados es importante tener en cuenta que el diseño experimental que empleamos permite identificar proteínas afectadas en el rizobio por la ausencia/presencia de SMc02366 tanto en estrés ácido como en forma independiente del pH. Ciertamente, será necesario realizar en el futuro un estudio para evaluar el perfil de expresión diferencial de proteínas asociadas al crecimiento de

Eme Δ RR vs Eme wt en condiciones de neutralidad para poder identificar el proteoma de expresión diferencial en función de la condición de pH del medio.

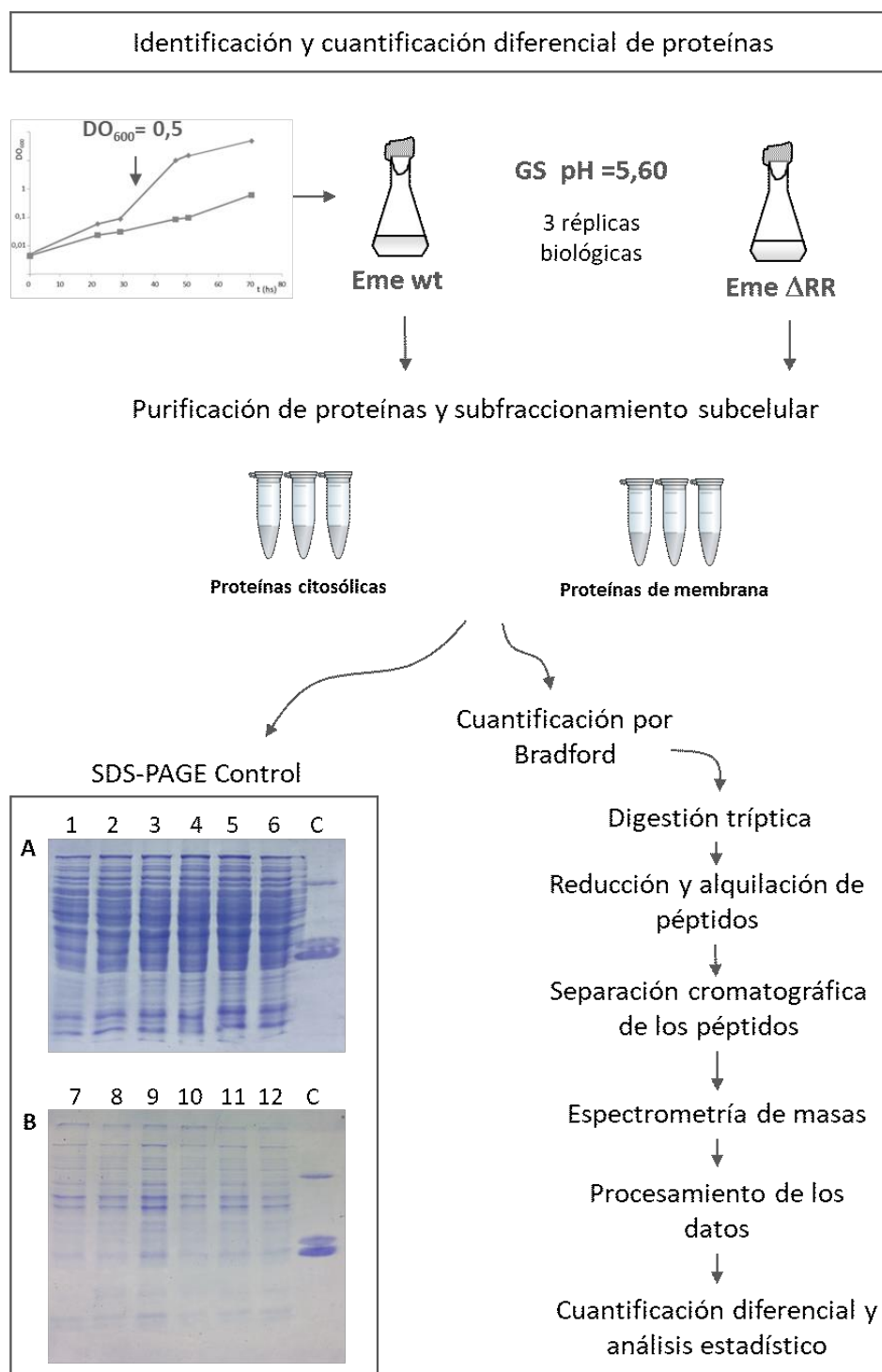


Figura 5. 1. Esquema de trabajo realizado para la identificación y cuantificación diferencial de proteínas.

Además del esquema de trabajo llevado a cabo para los análisis de proteínas por LC/MS-MS, esta figura muestra geles SDS-PAGE 13% para evaluar la calidad de proteínas citosólicas (**A**) y de membrana (**B**) obtenidas de cultivos Eme wt (calles 1-3; 7-9) o Eme Δ RR (calles 4-6; 10-12). C= flagelinas purificadas de *B. japonicum* utilizadas como control interno de la técnica (60 y 30 KDa).

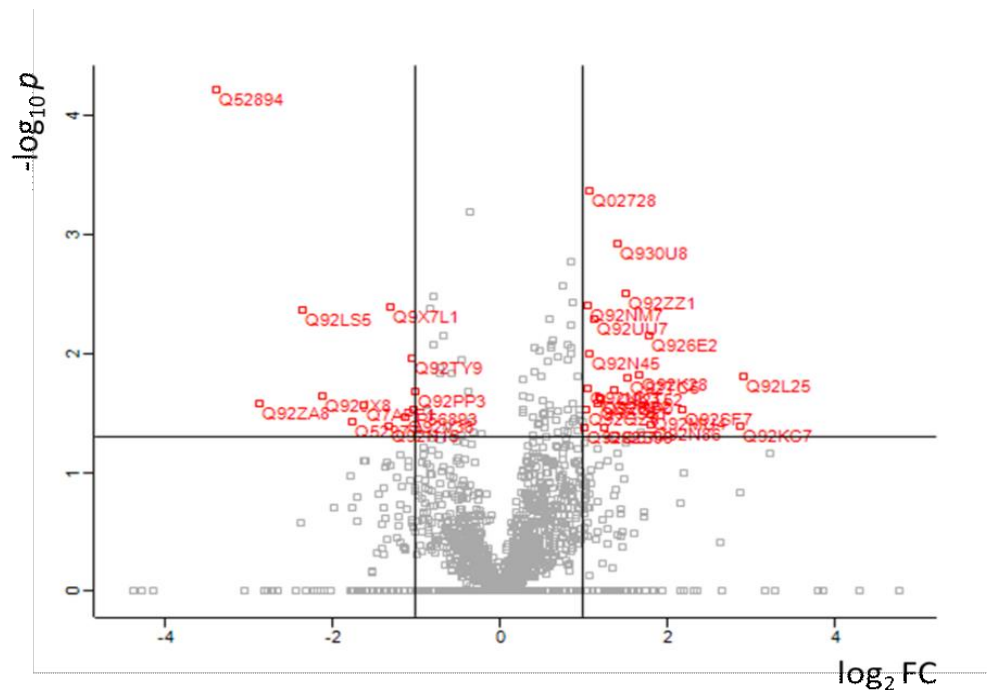


Figura 5. 2. Gráfico tipo volcano plot utilizado en la visualización de proteínas diferencialmente expresadas.

Este gráfico muestra la distribución de la abundancia de proteínas citosólicas obtenidas de células de Eme Δ RR cultivadas en medio mínimo GS pH 5,60 con respecto a proteínas citosólicas obtenidas de Eme wt obtenidas en la misma condición. Proteínas con una proporción de cambio (FC, *Fold Change*) mayor a 0 están sobre expresadas y las que tienen un FC<0 están inhibidas. El eje y corresponde a la significancia estadística del análisis univariado *t-student* para cada proteína (valor *p*). En rojo se muestran las proteínas (indicadas según su código de acceso) con $-2 < \text{FC} < 2$ (en el gráfico $-1 < \log_2 \text{FC} < 1$) y con valor $p < 0,05$ (en el gráfico $\log_{10} p > 1,3$) que corresponde al valor de corte que se utilizó este estudio. Los datos presentados corresponden al análisis estadístico de 3 muestras biológicas para cada cepa.

5.2.2. Proteínas de Clase I reprimidas en el mutante *E meliloti* Δ RR

Proteínas involucradas en el metabolismo del carbono

Pgi: Glucosa-6-P isomerasa. Esta enzima cataliza la conversión de fructosa-6-fosfato en glucosa-6-fosfato, necesaria para la catálisis de la fructosa por la vía Entner-Doudoroff de *E. meliloti*. Se ha reportado que la ausencia de este gen en *E. meliloti* imposibilita la utilización de fructosa como única fuente de carbono (Arias *et al.* 1979).

SMb21214: Este *locus* se identificó inicialmente en un estudio funcional de un *cluster* de genes presentes en *E. meliloti* responsables de la síntesis de EPSII. Nuestro análisis bioinformático asigna a esta proteína una actividad 2-desoxiglucosa-6-P fosfatasa, coincidente a lo que reportan otros autores (Becker *et al.* 1997).

Proteínas asociadas al metabolismo de lípidos

SMc00552/PssA: Fosfatidil-serina sintasa A. Enzima involucrada en la síntesis de fosfoetanolamina, fosfolípido de membrana de *E. meliloti* (Sohlenkamp *et al.* 2004).

Proteínas asociadas a la degradación de proteínas

DegP1: Serin-proteasa que se localiza en periplasma. En enterobacterias su función está relacionada con la degradación de proteínas del espacio periplásmico mal plegadas debido a situaciones de estrés (Danese *et al.* 1995). En *E. meliloti*, la función de DegP1 no es esencial para el desarrollo de una simbiosis exitosa con el hospedador. Mutantes *knock out*, *E. meliloti degP⁻*, fueron capaces de desarrollar nódulos fijadores de nitrógeno en *M. sativa* (Glazebrook *et al.* 1996). Recientemente, Draghi y colaboradores (2016) han reportado en cultivos continuos de *E. meliloti* a pH ácido un aumento tanto en la transcripción de este gen como en los niveles de esta proteína.

ClpP3: Serin-proteasa dependiente de ATP que forma un complejo multimérico con las proteínas ClpX. El complejo ClpXP tiene un rol activo en la degradación de proteínas mal plegadas (Baker y Sauer 2012).

Proteínas de transporte

EmrA: Constituye una bomba MDR (del inglés **Multidrug Resistance**) (Li *et al.* 2009) junto con EmrB. Se ha reportado que la transcripción de la bomba EmrAB se induce por compuestos flavonoides en *E. meliloti* (Rossbach *et al.* 2014).

SecY: Subunidad mayor del complejo SecYEG involucrado en direccionamiento y la translocación de proteínas al exterior celular. Las proteínas SecA y SecB son las encargadas de unirse a las proteínas recién sintetizadas y direccionarlas hacia el canal SecYEG. En nuestros ensayos proteómicos se detectó expresión diferencial sólo para SecY.

SMa2337/RhtX: Proteína de membrana encargada del transporte de rizobactina, sideróforo producido por *E. meliloti*. Los sideróforos son producidos por las bacterias en condiciones de bajas concentraciones de Fe^{+3} para lograr la captación de este metal. La rizobactina, no esencial para la simbiosis, contribuye a la eficiencia de la FBN en condiciones de bajas concentraciones de hierro (Barton *et al.* 1992, 1996). La proteína RhtX posee alto grado de homología con la familia bombas de membrana tipo MFS (**Major Facilitator Superfamily**).

SMc00265: Proteína de periplasma que forma parte de un transportador tipo ABC para el transporte de ácidos oxoalérico y oxobutírico. Los ORFs contiguos que codifican para los restantes componentes del sistema, no han manifestado una expresión diferencial en estos estudios.

SMc01457/AcrB: Junto con AcrA (que en estos ensayos fue incluido en los marcadores Clase II – *off* - ; ver Sección 5.2.4) constituyen una bomba MDR. Originalmente se la ha asignado como responsable de la resistencia a acriflavina. De ahí su acrónimo, **Acriflavin Resistance**.

MscK (**Mechanosensitive Channel**): Proteína de membrana que constituye un canal que se abre en respuesta a un incremento de la tensión de la membrana. Los canales MS (**Mechanosensitive**) juegan un papel importante en la regulación de la presión de turgencia de la membrana cuando una célula, previamente creciendo en un medio hipertónico, es expuesta a un medio hipotónico (estrés osmótico que se conoce como *downshock*). El estrés por *downshock* produce un aumento de la entrada de agua al citosol y los canales MS responden a la presión de turgencia justo antes que la pared celular se dañe (Levina *et al.* 1999). La apertura de estos canales facilita la salida de metabolitos desde el interior celular contrarrestando de esta manera la presión sobre la membrana que genera la entrada de agua (Berrier *et al.* 1992). En rizobios en particular, el rol de estos canales en vida saprofítica y simbiótica aún no ha sido explorado.

Proteínas involucradas en la transmisión de señales

SMa0137: Proteína con dos regiones transmembrana que delimitan un dominio CHASE periplasmático. La región intracelular posee un dominio GGDEF y un dominio EAL. En muchas bacterias, la transición entre una forma de vida móvil a una forma de vida sésil (con capacidad de formar *biofilms*) está regulada por mecanismos que responden a la concentración intracelular del segundo mensajero 3',5'-GMP bicíclico (c-di-GMP, 3',5'-*Cyclic*

di-GMP). La síntesis y la degradación de este compuesto están estrictamente reguladas por enzimas con actividad guanilato ciclasa en los dominios GGDEF y por enzimas fosfodiesterasas de los dominios EAL. En *Rhizobium etli* y *Rhizobium leguminosarum*, se ha descrito que la producción heteróloga de c-di-GMP resulta en un aumento de la síntesis de EPS, de la formación de *biofilms* y de la adhesión a raíz; y a su vez disminuye la eficiencia simbiótica y la capacidad de natación (*swimming*) de la bacteria (Pérez-Mendoza *et al.* 2014). El grupo de la Dra. Becker investigó el papel de 22 proteínas de *E. meliloti* que estarían asociadas con la síntesis, degradación o unión de c-di-GMP. Las mutaciones individuales en estos genes no causaron cambios evidentes en la formación de *biofilms*, motilidad, o biosíntesis de EPS. Por el contrario, la manipulación de los niveles de c-di-GMP por sobreproducción endógena o heteróloga de las diguanilato ciclasas o las fosfodiesterasas afectaron estos procesos y la acumulación de N-acil-homoserina lactonas en el sobrenadante del cultivo. A su vez, una cepa de *E. meliloti* que no produjo niveles detectables de c-di-GMP resultó más sensible al estrés ácido que la cepa salvaje. Sin embargo, fue simbióticamente eficiente, no vio afectada su movilidad y redujo solo ligeramente la formación de *biofilms* (Schäper *et al.* 2016).

SMc00765/McpZ: Las proteínas MCP (**M**ethyl-**a**ccpting **C**hemotaxis **P**roteins) detectan sustancias beneficiosas o nocivas e inician en la célula mecanismos de traducción de señales que resultan en un cambio de la dirección de *swimming* de la bacteria. Las MCP son generalmente proteínas de membrana que poseen en la región citosólica dominios que experimentan una metilación controlada conjuntamente por enzimas metiltransferasas (como CheR) y metilesterasas (como CheB1). Las MCP metiladas regulan la actividad de la HK CheA que tiene acción sobre el RR CheY2. CheY2 fosforilada modifica la velocidad de rotación del flagelo, y con ella la dirección de *swimming* (Scharf y Schmitt 2002). McpZ, junto con McpU (proteína de Clase II – *off* -, Sección 5.2.4), son 2 de las 8 MCP codificadas en el genoma de *E. meliloti*.

CheY2: En *E. meliloti*, la respuesta a sustancias quimioatrayentes o quimorepelentes está mediada en términos generales por la HK CheA y los RRs CheY2 y CheY1. CheY2 fosforilado por CheA (CheY2-P), interactúa con la región citoplasmática del motor flagelar modificando la velocidad de rotación del flagelo. El sistema se inactiva cuando, modulado por CheY1, CheY2-P retorna el fosfato a CheA (Scharf y Schmitt 2002).

La metilesterasa CheB1, codificada contigua a CheY2, se identificó como proteína de Clase II - *off* - (Sección 5.2.4).

SMc01042/NtrB: Histidina quinasa del TCS NtrC/NtrB. Si bien este TCS es requerido para la fijación de N₂ y para la expresión de los genes *nif* en *Klebsiella pneumoniae* y en *Azorhizobium caulinodans* (Patriarca *et al.* 2002), el TCS homólogo NtrB/NtrC no es esencial para la fijación simbiótica de nitrógeno en *E. meliloti* o *Bradyrhizobium japonicum* (Patriarca *et al.* 2002). Recientemente, se demostró que la expresión del asRNA mmgR está regulada en *E. meliloti* 2011 positivamente por NtrC y negativamente por AniA. Se cree que el promotor del asRNA mmgR integraría señales del metabolismo de C y N a través de, al menos, los reguladores globales NtrC y AniA para proporcionar un nivel óptimo del asRNA mmgR que permita ajustar post-transcripcionalmente la expresión génica según la disponibilidad variable de C y N (Ceizel Borella *et al.* 2018).

Otras funciones

SMa1077/Nex18: Esta proteína, aún no caracterizada en profundidad en rizobios, posee alta homología con la proteína de adhesión celular fasciclina I de *Drosophila melanogaster* (Elkins *et al.* 1990). Se ha descrito un aumento significativo de la transcripción de este ORF en etapas intermedias de la interacción de *E. meliloti*-*M. sativa*; y que la mutación en este gen produce una mezcla de nódulos fijadores y no fijadores, resultando en plantas hambreadas de nitrógeno (Oke y Long 1999). Esta proteína podría actuar directa o indirectamente en la adhesión de la bacteria en el nódulo (Oke y Long 1999). Posteriormente, Hellweg y colaboradores (Hellweg *et al.* 2009) encontraron que la transcripción de este gen se induce en respuesta a la exposición de *E. meliloti* a condiciones ácidas. Esta última evidencia, junto con nuestros resultados, sugieren que el RR SMC02366 podría ejercer algún tipo de control sobre la expresión de esta proteína.

5.2.3. Proteínas de Clase I sobre-expresadas en el mutante *E. meliloti* Δ RR

Proteínas involucradas en el metabolismo del carbono

IlvD1: Galactonato deshidratasa. Involucrada en la degradación de galactosa por medio de la vía De Ley-Doudoroff de *E. meliloti*. El *loci* que codifica esta enzima posee 5 genes, todos formando parte de las primeras etapas de ésta vía (Geddes y Oresnik 2012). Una de ellas,

DgoK1 - con actividad 2-ceto-3-desoxigalacto quinasa - mostró un comportamiento similar a IlvD1 en nuestros estudios (FC: 1,8; valor-*p*: 0,003). Geddes y Oresnik (2012) reportaron que DgoK1 es necesaria para metabolizar galactosa, mientras que IlvD1 es dispensable. Estos autores indican además que la incapacidad de catabolizar galactosa correlaciona con un aumento de la competencia por la nodulación

Pgl: Fosfogluconolactonasa. Esta enzima cataliza la conversión de 6-fosfoglucolactona en 6-fosfogluconato. La 6-fosfoglucolactona deriva de la oxidación de glucosa-6-fosfato en las primeras reacciones de la vía Entner-Doudoroff (ED). *pgl* está flanqueado en el genoma por genes que codifican para las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Zwl) que actúa primero a Pgl en la vía ED, y 6-fosfogluconato deshidratasa (Edd) que actúa después (Barra *et al.* 2003). La organización génica *zwl-pgl-edd* sugeriría niveles de expresión similares para las 3 proteínas. En nuestros análisis, sólo Edd (FC: 1,8; valor-*p*: 0,006) mostró un comportamiento similar a Pgl.

SMc02114: Proteína no caracterizada con actividad hidrolasa. Las enzimas con esta actividad intervienen en procesos catabólicos, al hidrolizar enlaces C-O, C-N y C-C.

ExoA y ExoN (*exopolysaccharide biosynthesis*): Proteínas con actividad glicosil transferasa. Forman parte del operon *exoHKLAMONP* cuyos genes son necesarios para la síntesis de succinoglicano (EPSI) (Becker *et al.* 1993). Hellweg y colaboradores (Hellweg *et al.* 2009) realizaron un análisis global del curso temporal de la respuesta transcriptómica en *E. meliloti* después de pasar las células bacterianas de pH neutro a pH ácido y encontraron que la transcripción de casi todos los genes del cluster *exo* aumenta al exponer a la bacteria a condiciones ácidas.

ExoF: Proteína de membrana encargada de translocar hacia el exterior celular los exopolisacáridos sintetizados en la cara interna de la membrana (Staehelin *et al.* 2006). Las polimerasas ExoP y ExoQ que intervienen en dicha síntesis, no tuvieron una expresión diferencial.

Proteínas asociadas al metabolismo de lípidos

SMc00582/LptD: Proteína de membrana que forma un complejo con LptE (LptDE) encargado de ensamblar LPS en la membrana (Botos y Buchanan 2017)

SMc01845/MltB2: Basándonos en sus dominios conservados, es una proteína asociada a la membrana con actividad hidrolítica sobre los enlaces del ácido mureínico de la pared celular (Krogh y Devine 1998). Draghi y colaboradores (2016) han reportado en cultivos continuos de *E. meliloti* a pH ácido un aumento de este marcador tanto a nivel transcriptómico como proteómico.

Proteínas asociadas a la biosíntesis de proteínas

RpmF y RpsR: Proteínas que forman parte de la subunidad 50S y 16S, respectivamente.

SMc01173/AlaS2 y SMc02723/QueF: Involucradas en el metabolismo de tRNAs (ARN de transferencia).

Proteínas vinculadas al metabolismo de ácidos nucleicos

SMc04124/Cdd: Cataliza la hidrólisis de citidina para dar uridina y amonio como productos (Lund, 2014). Probablemente el amonio así generado sea utilizado en el citosol para el mantenimiento del pH_i al generar iones amonio.

SMc01877/RecN: Proteína involucrada en la reparación del ADN.

Proteínas de transporte

AgIE (*alpha-glucoside binding protein*): es una proteína de unión a solutos integrante de un sistema de transporte de tipo ABC con afinidad por α -glucósidos. Este sistema es el principal responsable del transporte de sacarosa, además del transporte de trehalosa y maltosa (Willis y Walker 1999). Esta proteína está codificada en el operón *agIEFGAK*. *agIF*, *agIG* y *agIK* codifican para proteínas integrales de membrana encargadas de transportar α -glucosidos hacia el interior celular. AgIA posee actividad glucosidasa (Willis y Walker 1999). De todos ellos, sólo AgIE fue hallado con una expresión diferencial en nuestros estudios.

SMa0585/NrtA: una proteína de unión a soluto con afinidad por iones nitrato integrante de un sistema de transporte de tipo ABC. Las demás proteínas que componen el sistema, no han sido detectadas como diferenciales.

SMc01657/FhuA2: Cuiv y colaboradores (2008) han sugerido la presencia de un segundo sistema de adquisición de hemo en *E. meliloti* (Cuiv *et al.* 2008). Este organismo también

puede adquirir hierro a partir de los xenosideróforos y se ha propuesto a *fhuA1* y *fhuA2* como los genes que codifican los receptores de la membrana externa para ferricromo y ferrioxamina B, respectivamente.

RopA1: Basándonos análisis *in silico* esta proteína corresponde al grupo de las porinas, proteínas que atraviesan la membrana varias veces y forman un pequeño canal que permite el paso de pequeños metabolitos a través de la membrana externa. En *E. meliloti*, esta proteína ha sido caracterizada como necesaria para la unión y posterior infección de los bacteriofagos M12 y N3 (Crook *et al.* 2013).

DppA1: es una proteína de unión a soluto integrante de un sistema de transporte de tipo ABC. Han sido caracterizados tres sistemas de transporte ABC involucrados en la captación de oligopéptidos por *E. meliloti*, y se han observado interacciones complejas entre los tres sistemas a nivel transcripcional: *opp* se regula positivamente a través de DppA1, mientras que *dpp1* está negativamente regulado a través de DppA1. Además, se ha determinado que estos sistemas de transporte no son esenciales para el establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno con la alfalfa (Nogales *et al.* 2009).

SMc02118/AapJ: es una proteína de unión a soluto de un sistema de transporte general de aminoácidos de tipo ABC. Se ha reportado en *E. meliloti* que el doble mutante de delección *livK⁻ / aapJ⁻* no está alterado en la simbiosis con alfalfa (Prell *et al.* 2010).

SMc02274/RkpU: Proteína de membrana involucrada en la exportación de KPS (polisacáridos de la cápsula). En la literatura se ha descrito que la ausencia de este gen en *E. meliloti* repercute en fenómenos de competencia por la nodulación en alfalfa (Pobigaylo *et al.* 2008).

Proteínas asociadas a estrés

SMc01585/CspA3 y SMA0181/CspA7 (*csp*, **C**old **S**hock **P**rotein): Pequeñas proteínas cuya transcripción se induce en condiciones de *shock* frío. En *E. meliloti*, mediante mutagénesis por transposición, se identificaron varias copias homólogas al principal gen de *shock* frío *cspA* de *E. coli* (O'Connell y Thomashow 2000). En *E. coli* CspA tiene la capacidad de unirse al ARNm y prevenir la formación de estructuras secundarias del ARNm, naturalmente favorecidas a bajas temperaturas (Jiang *et al.* 1997).

5.2.4. Proteínas diferenciales de Clase II

Proteínas de transporte

SMc02739/ChoV: Proteína de unión a soluto integrante de un sistema de transporte de tipo ABC involucrado en la captación de colina. La captación de colina por rizobios es importante desde dos aspectos. En primer lugar la colina es el precursor de fosfatidilcolina, fosfolípido principal de la membrana de la familia Rhizobiaceae y necesario para el crecimiento normal de miembros de este grupo (de Rudder *et al.* 2000). En segundo lugar, la capacidad de *E. meliloti* de utilizar colina como fuente de carbono es una ventaja para los bacteroides diferenciados, ya que pueden metabolizar este compuesto presente en nódulos y en simbiosomas (Dupont *et al.* 2004; Poggi 2003).

SMa1447: Proteína de membrana no caracterizada correspondiente a la familia de bombas MFS (Reddy *et al.* 2012)

SMc04350/MacA: MacAB forma parte una bomba MDR de tipo ABC (Eda *et al.* 2011).

SMc04351/MacB: MacAB forma parte una bomba MDR de tipo ABC (Eda *et al.* 2011).

SMc01458/AcrA: Junto con AcrB (Sección 5.2.2) constituyen una bomba MDR. Originalmente se la ha asignado como responsable de la resistencia a acriflavina. De ahí su acrónimo, *Acriflavin Resistance*.

Proteínas involucradas en la transmisión de señales

SMc03010/CheB1: Proteína con actividad metilesterasa que actúa modulando los niveles de metilación de las proteínas MCP, involucradas en procesos de quimiotaxis (Scharf y Schmitt 2002). Ver también CheY2, Sección 5.2.2

SMc00975/McpU: Junto con McpZ (ver Sección 5.2.2), es una de las 8 proteínas MCP que posee *E. meliloti*. Las MCP son proteínas de membrana que experimentan metilación enzimática en los dominios citosólicos en respuesta a sustancias atrayentes o repelentes. Modulan la actividad de la HK CheA que tiene acción regulatoria sobre el RR CheY2. CheY2 fosforilada modula la velocidad de rotación del flagelo y cambia en consecuencia la dirección de *swimming* de la bacteria (Scharf y Schmitt 2002).

Tabla 5. 1. Lista de proteínas de Clase I reprimidas en el mutante Eme Δ RR.

Las proteínas se obtuvieron de células cultivadas en medio mínimo GS a pH: 5,6 (proporción de cambio mayor a 2 y valor-p menor a 0,05).

Nombre asignado	Código de acceso	Locus tag/gen	Proporción de cambio	Valor-p	Descripción	Localización	COG
DegP	Q52894	SMc02365	10,4	6×10^{-5}	Proteasa de localización periplasmica.	Citosol	O
McsK	Q92RE2	SMc00028	8,8	0,047	Canal que interviene en la regulación de la turgencia celular.	Membrana	M
AcrB	Q92NP7	SMc01457/ <i>acrB</i>	7,9	0,003	Bomba de expulsión de drogas.	Membrana	P
Nex18	Q92ZA8	SMa1077/ <i>nex18</i>	7,3	0,027	Peptido que se induce en simbiosis.	Citosol	n.a
-	Q92RX8	SMc00765/ <i>mcpZ</i>	5,3	0,007	Proteína asociada a quimiotaxis.	Membrana	S
Pgi	Q92LS5	SMc03139	5,1	0,004	Glucosa-6-P-isomerasa.	Citosol	M
-	Q92JX8	SMc03977	4,3	0,023	Función desconocida.	Citosol	n.a
-	Q930X2	SMa0137	3,6	0,039	Diguanilato ciclasa/fosfodiesterasa.	Membrana	T
NtrB	Q52977	SMc01042/ <i>ntrB</i>	3,4	0,038	Histidina quinasa del TCS NtrB/NtrC.	Citosol	T
-	Q7APE0	SMc00552/ <i>pssA</i>	3,3	0,028	Fosfatidilserina sintasa.	Membrana	I
SecY	Q92QF0	SMc01289/ <i>secY</i>	3,2	0,019	Subunidad principal del canal de translocación de proteínas SecYEG.	Membrana	U
CheY2	Q7APF1	SMc03011/ <i>cheY2</i>	3,1	0,027	Regulador de respuesta involucrado en mecanismos de quimotaxis.	Citosol	T
FlIF	O54239	SMc03014/ <i>fliF</i>	3,0	0,009	Proteína "M-ring" del flagelo.	Membrana	N
ClpP3	Q9X7L1	SMc02720/ <i>clpP3</i>	2,5	0,004	Proteasa dependiente de ATP.	Citosol	O

Tabla 5.1. Continuación.

Nombre asignado	Código de acceso	<i>Locus tag/gen</i>	Proporción de cambio	Valor-p	Descripción	Localización	COG
EmrA	Q92LW4	SMc03168	2,5	0,017	Bomba de expulsión de drogas.	Membrana	V
RhtX	Q92XI7	SMa2337/ <i>rhtX</i>	2,3	0,012	Proteína de transporte de sideróforos.	Membrana	n.a.
-	Q92V36	SMb21214/ <i>orf24</i>	2,2	0,034	2-desoxiglucosa-6-P-fosfatasa.	Citosol	S
MinC	Q92TY9	SMb21524/ <i>minC</i>	2,1	0,011	Proteína involucrada en la división celular.	Citosol	D
-	Q92PP3	SMc00265	2,0	0,020	Proteína de periplasma involucrada en el transporte de ácido oxobutírico y oxovalérico.	Citosol	G
-	P56893	SMc00090/ <i>cysN</i>	2,0	0,029	Sulfato adenililtransferasa.	Citosol	P

n.a.: no asignado.

Tabla 5. 2. Lista de proteínas de Clase I sobre-expresadas en el mutante Eme Δ RR.

Las proteínas se obtuvieron de células cultivadas en medio mínimo GS a pH: 5,6 (proporción de cambio mayor a 2 y valor-p menor a 0,05).

Nombre asignado	Código de acceso	<i>Locus tag/gen</i>	Proporción de cambio	Valor-p	Descripción	Localización	COG
RpmF	Q92L25	SMc03881/ <i>rpmF</i>	7,5	0,016	Proteína L30 de la subunidad ribosomal 50S.	Citosol	J
-	Q92KC7	SMc01173/ <i>alaS2</i>	7,4	0,040	Involucrada en la síntesis de alanil-ARNt.	Citosol	S
LptD	Q92KG5	SMc00582/ <i>lptD</i>	6,3	0,001	Proteína involucrada en el ensamblado de LPSs en la superficie de la membrana.	Membrana	M
ExoA	P33691	SMb20957/ <i>exoA</i>	6,1	0,026	Glicosiltransferasa involucrada en la síntesis del EPSI.	Membrana	G

Tabla 5.2. Continuación.

Nombre asignado	Código de acceso	Locus tag/gen	Proporción de cambio	Valor-p	Descripción	Localización	COG
ExoN	P33696	SMb20960/ <i>exoN</i>	4,7	0,001	Glicosiltransferasa involucrada en la síntesis del EPSI.	Membrana	G
-	Q92VZ1	SMb20816	3,7	0,005	Función desconocida.	Membrana	M
CspA3	Q92N86	SMc01585/ <i>cspA3</i>	3,5	0,040	Involucrada en la respuesta al <i>shock</i> frío. Interviene en la regulación de la transcripción.	Citosol	K
-	Q7ANQ7	SMb21310	3,5	0,017	Función desconocida.	Membrana	n.a.
-	Q92K28	SMc01549	3,2	0,015	Función desconocida.	Citosol	n.a.
AgIE	Q9Z3R5	SMc03061/ <i>agIE</i>	3,0	0,017	Proteína de periplasma involucrada en la incorporación de sacarosa, maltosa o trehalosa.	Citosol	G
-	Q92TC5	SMc02761/ <i>trxA</i>	2,9	0,016	Tioredoxina.	Citosol	O
-	Q92ZZ1	SMa0585/ <i>nrtA</i>	2,8	0,003	Proteína de periplasma involucrada en el transporte de nitrato.	Citosol	P
-	Q926C6	SMc01657/ <i>fhuA2</i>	2,7	0,016	Proteína de transporte de sideróforos	Membrana	P
-	Q92T52	SMc04124/ <i>cdd</i>	2,6	0,020	Citidina deaminasa. Produce uridina y amonio a partir de citidina.	Citosol	F
Cspa7	Q930U8	SMa0181/ <i>cspA7</i>	2,6	0,0012	Involucrada en la respuesta al <i>shock</i> frío.	Citosol	K
-	Q92KE5	SMc00996	2,6	0,008	Carboxipeptidasa con acción en peptidoglicanos.	Membrana	M
RopA1	Q92R60	SMc02396	2,5	0,018	Porina que permite el paso de metabolitos.	Membrana	M

Tabla 5.2. Continuación.

Nombre asignado	Código de acceso	<i>Locus tag/gen</i>	Proporción de cambio	Valor-p	Descripción	Localización	COG
-	Q92S89	SMc02226	2,4	0,042	Función desconocida.	Citosol	S
-	Q92RW0	SMc00786/ <i>dppA</i> 1	2,3	0,0007	Transportador de tipo ABC.	Membrana	E
IlvD1	Q92RP0	SMc00884/ <i>ilvD1</i>	2,3	0,024	Proteína involucrada en el catabolismo de galactosa.	Citosol	E
Pgl	Q9Z3S1	SMc03069/ <i>pgl</i>	2,3	0,026	Cataliza la hidrólisis de 6-fosfogluconolactona en 6-fosfogluconato.	Citosol	G
-	Q92RB2	SMc00453	2,3	0,023	Función desconocida.	Citosol	S
-	Q92Q71	SMc02118/ <i>aapJ</i>	2,2	0,0042	Transportador de tipo ABC.	Membrana	E
-	Q92S50	SMc02274/ <i>rkpU</i>	2,2	0,046	Proteína de transporte de polisacáridos.	Membrana	M
-	Q92UU7	SMb21549/ <i>thtR</i>	2,2	0,0052	Tiosulfato-cianida transulfurasa.	Citosol	P
RecN	Q92NM7	SMc01877/ <i>recN</i>	2,1	0,0040	Involucrada en la reparación del ADN.	Citosol	L
ExoF	Q02728	SMb20945/ <i>exoF</i>	2,1	0,0004	Proteína involucrada en la síntesis del EPSI.	Citosol	M
-	Q92NK3	SMc01845/ <i>mltB2</i>	2,1	0,020	Transglicosilasa que actúa en la hidrólisis de ácido murámico.	Citosol	M
-	Q92N45	SMc02723/ <i>queF</i>	2,1	0,0101	Enzima involucrada en la modificación de ARNt.	Citosol	S
RpsR	Q92QZ8	SMc00567/ <i>rpsR</i>	2,0	0,030	Proteína S18. Forma parte de la subunidad 16S del ARNr.	Citosol	J
-	Q92Q67	SMc02114	2,0	0,042	Proteína con actividad hidrolasa.	Citosol	S

n.a.: no asignado.

Tabla 5. 3. Proteínas de Clase II. Proteínas presentes o ausentes (*on/off*) en Eme Δ RR (respecto a Eme wt).

Nombre asignado	Código de acceso	<i>Locus tag/gen</i>	localización	<i>on/off</i>	Descripción	COGs
-	Q92YS3	SMa1447	Membrana	<i>off</i>	Transportador de solutos	G
MacA	Q92NV0	SMc04350/ <i>macA</i>	Membrana	<i>off</i>	Bomba de expulsión de drogas	M
MacB	Q92NU9	SMc04351/ <i>macB</i>	Membrana	<i>off</i>	Bomba de expulsión de drogas	M
-	Q92RJ4	SMc00975/ <i>mcpU</i>	Membrana	<i>off</i>	Proteína involucrada en quimiotaxis	S
-	Q92N35	SMc02739/ <i>choV</i>	Citosol	<i>off</i>	Transportador de tipo ABC	E
-	Q92NP6	SMc01458/ <i>acrA</i>	Citosol	<i>off</i>	Bomba de expulsión de drogas	M
FlgK	Q92RZ2	SMc03048/ <i>flgK</i>	Citosol	<i>off</i>	Proteína asociada al gancho del flagelo	N
-	Q92R88	SMc02366	Citosol	<i>off</i>	Regulador de respuesta	T
-	Q52883	SMc03010/ <i>cheB1</i>	Citosol	<i>off</i>	Regulador de respuesta involucrado en quimiotaxis	T
-	Q92KJ4	SMc00096	Membrana	<i>on</i>	Función desconocida	S
-	Q92KL8	SMc00924	Citosol	<i>on</i>	Función desconocida	M
-	Q92T41	SMc04111/ <i>cpaC1</i>	Citosol	<i>on</i>	Proteína involucrada en el ensamblado del pili	U

5.3. Conclusiones

En este capítulo hemos presentado el abordaje al estudio del regulón del SMc02366 a nivel proteómico. Con esta estrategia hemos evaluado los cambios globales en la expresión génica producto de la mutación en el regulador transcripcional SMc02366.

La misma nos ha permitido reconocer y describir un conjunto de marcadores diferenciales que están vinculados y participan de diversos procesos metabólicos celulares. Esta observación refleja claramente la naturaleza de regulador transcripcional y da sustento al uso de aproximaciones ómicas como la que hemos utilizado. El análisis proteómico ha permitido identificar una lista de especies moleculares cuyo patrón de expresión puede ser asociado con el crecimiento de los rizobios en ausencia del regulador. Intentamos explorar posibles correlaciones funcionales que permitan explicar la presencia de los diferentes marcadores observados en el contexto de una respuesta celular en la condición ensayada (estrés ácido). Para ello, hemos analizado la función bioquímica de cada uno de los marcadores, y agrupado los mismos de acuerdo a su pertenencia a los grupos de genes ortólogos (COG) (Tablas 5.1, 5.2 y 5.3). Dichos grupos incluyen a las proteínas en categorías funcionales teniendo en cuenta las relaciones ortólogas entre las mismas, asumiendo que dichas proteínas evolucionaron a partir de un ancestro común a través de eventos de duplicación y especiación.

En el conjunto de proteínas celulares de Eme Δ RR se identificaron 51 proteínas (Clase I) significativamente alteradas en sus niveles respecto a la cepa salvaje y 12 proteínas resultaron ausentes o presentes (Clase II). **En total se detectaron 63 proteínas que podrían estar reguladas ya sea a través de una intervención directa o como consecuencia fisiológica de los efectos primarios del regulador. SMc02366 actuaría, al menos, induciendo la expresión de 29 proteínas y modulando en forma negativa otras 34.** Estas proteínas están vinculadas con una gran variedad de procesos metabólicos relacionados con el metabolismo central del carbono, el recambio de proteínas, el transporte de metabolitos a través de la membrana, y procesos de quimiotaxis. Como comentamos en la introducción, los RRs en general pueden actuar como activadores o como represores de la transcripción génica.

No hemos encontrado evidencia a favor de que los marcadores moleculares ya reportados en rizobios e involucrados directamente en la tolerancia a la acidez o a estrés por cobre estén asociados a la regulación de SMc02366. Los genes *phrR*, *gshB*, *exoH*, *exoR*, *actA*, *lpiA*, *actS*, *actR* y *actP*, han sido reportados como genes que intervienen en mecanismos de tolerancia a la acidez (Glenn *et al.* 1999; Reeve *et al.* 1998; Riccillo *et al.* 2000; Tiwari *et al.* 1996). De todos ellos, solo la proteína ActS, que forma parte de la histidina quinasa del TCS ActS/ActR, presentó una expresión diferencial en nuestros estudios (reprimida con un FC=2,2) pero no fue incluido en el análisis por tener una significancia estadística por fuera del punto de corte elegido (valor- $p=0,08$). Estos resultados sugieren que SMc02366 intervendría en mecanismos de tolerancia a la acidez distintos a los que ya han sido descritos.

En relación a la marcada sensibilidad a cobre de los mutantes del TCS SMc02366/SMc02367 (Capítulo 4, Sección 4.2.8), nuestros resultados sugieren que el RR **SMc02366 no tendría acción regulatoria sobre las cinco Cu^+ -ATPasas codificadas en *E. meliloti*** descritas y caracterizadas en el grupo del Dr. Argüello (Patel *et al.* 2014), encargadas de exportar el exceso de Cu^+ de la célula y de constituir una línea vital de defensa frente a concentraciones tóxicas de Cu^+ (Argüello *et al.* 2011; Argüello *et al.* 2013; Munson *et al.* 2000).

El impacto negativo en los niveles de la proteasa de localización periplásmica DegP1 en Eme ΔRR (disminuida con un FC= 10,8; valor $p=6 \times 10^{-5}$) resultó consistente con los aumentos transcripcionales y traduccionales de este gen - y del RR SMc02366 - que han sido reportados en estudios ómicos de *E. meliloti* en situaciones de estrés ácido (Draghi *et al.* 2016; Hellweg *et al.* 2009) y en estudios transcriptómicos de secciones de nódulos (Roux *et al.* 2014). **Este hallazgo sugiere que en condiciones ácidas, *E. meliloti* aumenta la expresión del RR SMc02366 y regula positivamente la transcripción de *degP1*.** La validación de esta hipótesis requerirá estudios adicionales. En *E. coli*, DegP se ubica en periplasma y su función es degradar proteínas mal plegadas. El pH citosólico ácido o alcalino (Danese y Silhavy 1998), la adhesión celular a superficies (Otto y Silhavy 2002), o la ausencia de chaperonas (Jones *et al.* 1997), pueden generar errores de plegamiento. En particular, estas situaciones son detectadas por la HK CpxA del TCS CpxA/CpxR (Vogt y Raivio 2012) y la respuesta involucra la inducción de un gran número de genes, en los que se encuentra *degP* (Pogliano *et al.* 1997).

Otro de los marcadores regulados positivamente por SMc02366 -u otra molécula intermediaria- es MscK. MscK es capaz de detectar incrementos en la turgencia celular y

como consecuencia modificar su estructura para formar un canal que deja pasar metabolitos citosólicos de tamaño adecuado, restableciendo así la turgencia. Si bien en la literatura no está descrito un rol de estos tipos de canales en la tolerancia a la acidez, un posible escenario podría ser la utilización de MscK para expulsar H^+ del interior celular y así aumentar el pH a valores normales. Esta hipótesis se sustenta en la inespecificidad que poseen estos canales para expulsar solutos (Haswell *et al.* 2011).

Dado nuestros resultados y que ha sido reportado que *E. meliloti* induce la expresión del RR SMC02366 y el ORF SMA1077 (Nex18) en condiciones ácidas (Hellweg *et al.* 2009) y en etapas tempranas (Oke y Long 1999) y tardías del proceso simbiótico (Roux *et al.* 2014), **es posible que el pH ácido del hilo de infección (Geddes *et al.* 2014) y/o del simbiosoma (Pierre *et al.* 2013) induzca la expresión del RR SMC02366 y en consecuencia aumente los niveles de Nex18.** En este sentido, la escasa información funcional respecto al rol de Nex18 en el proceso simbiótico dificulta la interpretación del impacto de su regulación sobre la biología de los rizobios.

Otros de los **cambios más notorios observados en la proteómica comparativa resultaron asociados a proteínas que intervienen en la expulsión de drogas u otros metabolitos, como los sistemas AcrAB; MacAB; la proteína EmrA; y el ORF SMA1447.** Todas ellas se encontraron reprimidas en el mutante Eme Δ RR y se ha descrito que estos sistemas participan en la colonización de huéspedes eucarióticos. Resulta interesante estudiar en detalle la posible regulación de estas proteínas. En particular, Hellweg y colaboradores (2009) observaron que ante la exposición de *E. meliloti* a condiciones de estrés ácido, se induce la transcripción de SMC02366, *acrB*, *macA* y *emrA*; y Rossbach y colaboradores (2014) observaron la inducción de los transcriptos de *emrA* y *emrB* en respuesta a flavonoides, sugiriendo que los niveles de estas proteínas podrían impactar en la interacción simbiótica.

Otro de los marcadores que podrían impactar en el proceso simbiótico es ChoV. Esta proteína participa en el transporte de colina a través de la membrana de la bacteria (Dupont *et al.* 2004). La capacidad que tiene *E. meliloti* de utilizar colina como fuente de carbono es una ventaja en la etapa de bacterioide dentro del nódulo, ya que este compuesto se encuentra naturalmente en este tejido (Poggi *et al.* 2003). **De existir una regulación de SMC02366 sobre la expresión de *choV* en el ambiente ácido del simbiosoma, es probable que la cepa Eme Δ RR (o cepas mutantes en la HK del TCS predicho) manifiesten una**

utilización deficiente de colina como fuente de carbono y tal característica repercute en una simbiosis menos eficiente.

En este mismo sentido, la regulación positiva de SMC02366 sobre la expresión de proteínas que participan en la quimiotaxis (McpU; McpZ; CheY2; y CheB1) posiblemente repercute en el fenotipo simbiótico ya que los mecanismos de quimiotaxis son procesos tempranos de la interacción con el huésped, que permiten que el rizobio detecte los metabolitos exudados por la planta y reoriente el sentido del nado hacia la raíz (Ames y Bergman 1981). En particular, *E. meliloti* posee ocho proteínas quimiorreceptoras MCP en la membrana (McpS-McpZ) encargadas de regular los niveles de fosforilación de la HK CheA en respuesta a la detección de compuestos atrayentes o repelentes. La regulación de la actividad de CheA tiene implicancias en la fosforilación del RR CheY2, que en este estado (CheY-P) es capaz de unirse al complejo flagelar modificando la velocidad de rotación del flagelo rizobial. Como resultado, el rizobio cambia la dirección de *swimming* acercándose a alejándose a la sustancia quimioactiva. Recientemente, McpU ha sido descrito como un quimiorreceptor con especificidad para detectar aminoácidos no cargados (Webb *et al.* 2017).

Finalmente, en relación al metabolismo central del carbono, los rizobios de crecimiento rápido como *E. meliloti* se diferencian de los de crecimiento lento ya que los primeros poseen la capacidad de metabolizar disacáridos (Martinez-de Drets *et al.* 1974). Los genes responsables de la captación y degradación de sacarosa, fuente de carbono utilizada en estos estudios, están codificados en el cluster *agl*/EFGAK (Willis y Walker 1999). Luego de la captación de sacarosa, ocurre la hidrólisis del mismo en fructosa y glucosa por la α -glucosidasa AglA. Ambos monosacáridos deben ser convertidos a glucosa-6-P (G6P) para oxidarse luego por la vía Entner–Doudoroff (Geddes y Oresnik 2014). Es decir que por cada molécula de sacarosa, podrían entrar a la vía oxidativa 2 moléculas de G6P. La disminución de la isomerasa Pgi - involucrada en la conversión de fructosa-6-P (F6P) a G6P - que observamos en Eme Δ RR crecidas en GS a pH ácido, podría repercutir en un cambio en los flujos metabólicos. Una alteración en la interconversión reversible de F6P a G6P, podría impactar en el catabolismo de la fructosa. Ante esta situación, la célula podría aumentar el catabolismo de sacarosa para contrarrestar esa pérdida. En efecto, nuestros resultados muestran un aumento de AglE (responsable de la captación de sacarosa) y un aumento de 2 enzimas de la primera etapa de la vía ED (Pgl y Edd).

Con frecuencia los estudios proteómicos generan nuevos interrogantes acerca de las proteínas desconocidas y reflejan la complejidad de los sistemas biológicos. Si bien no se ha avanzado aún en la caracterización de la relevancia biológica de las 8 proteínas diferenciales encontradas con función desconocida, serán blanco inmediato de próximas investigaciones.

Dado que los estudios de este capítulo fueron realizados con el objetivo de evidenciar proteínas diferenciales consecuencia de la ausencia del RR SMc02366 en medio ácido, será necesario en el futuro realizar un estudio similar a pH neutro para vincular la regulación de la expresión de estas proteínas de manera independiente (o no) del pH.

En los siguientes capítulos, con el propósito de extender el análisis global a través de la determinación de los cambios celulares que suceden ante la ausencia de SMc02366, analizaremos el metaboloma de *E. meliloti* y sus consecuencias simbióticas.

Búsqueda e identificación de
metabolitos intracelulares afectados
por SMc02366 en *E. meliloti*
cultivado a pH ácido y neutro.
Un enfoque metabolómico.

Capítulo 6

6.1. Introducción

Disponer de la identidad y la función probable de los marcadores proteicos asociados al rol celular del RR SMc02366 en condiciones ácidas, nos ha abierto la posibilidad de comenzar a comprender los cambios que operan en la bioquímica de *E. meliloti* en los que SMc02366 (y/o el TCS SMc02366/SMc02367) está asociado. Muchas de esas proteínas poseen actividad enzimática y pueden estar involucradas en la modulación del metabolismo que finalmente determinará el fenotipo del organismo. Perturbaciones en el transcriptoma, resultarán en cambios en los niveles enzimáticos y a su vez en perturbaciones de los perfiles metabólicos. Conocer los niveles citosólicos de sustratos y productos que se asocian a las actividades de las proteínas mencionadas será una pieza importante hacia la comprensión bioquímica de los mecanismos que regula este posible TCS en la tolerancia a la acidez.

La metabolómica, como herramienta, comprende una serie de técnicas y tecnologías analíticas con alta capacidad de procesamiento (*high throughput*) que permiten el estudio global (total o parcial) de las pequeñas moléculas que conforman el metaboloma de un organismo, incluyendo carbohidratos, aminoácidos y ácidos orgánicos, entre otros. La determinación de perfiles metabólicos utilizando cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC-MS) es una de las técnicas más difundidas para el estudio del metaboloma de bacterias y es aceptada como una técnica muy robusta (Lämmerhofer y Weckwerth 2013). Una de las ventajas que ofrece esta tecnología es que ha sido utilizada a ritmo sostenido desde hace años y en consecuencia existen protocolos estables de extracción, derivatización, configuración de los equipos, e interpretación de los cromatogramas (Barsch *et al.* 2004; Fernie *et al.* 2004). Esta tecnología ya ha sido utilizada en rizobios para el estudio de las respuestas a nivel metabólico durante la nodulación (Colebatch *et al.* 2004; Desbrosses *et al.* 2005) y en *E. meliloti* en vida libre (Draghi *et al.* 2017; Draghi *et al.* 2016)

Para reconstruir las complejas redes y caminos que caracterizan los fenotipos de una bacteria, es necesario integrar los perfiles metabólicos con los resultados obtenidos en otros estudios ómicos. La combinación de datos proteómicos y metabolómicos, es una estrategia prometedora para lograr descifrar los efectos fisiológicos que genera el regulador y/o sus genes blanco para llevar a cabo la respuesta específica en condiciones óptimas y a bajo pH.

Considerando que la predicción de actividad en una ruta metabólica específica es dependiente de medidas de flujos a través de la misma, la disponibilidad de información referida a cambios en algunas de sus enzimas y/o metabolitos aporta evidencia muy acotada respecto de la tasa de funcionamiento. Las medidas de flujos metabólicos en nuestro sistema resultan inabordables dado que existe escaso conocimiento respecto sobre cuáles son las vías involucradas en la respuesta bajo análisis (rol de SMc02366 en la biología de *E. meliloti* y en condiciones de estrés ácido), así como de sus posibles conectividades.

En este capítulo presentaremos la determinación cuantitativa de diferentes metabolitos de bajo peso molecular presentes en células de Eme Δ RR y Eme wt cultivadas en dos condiciones de pH, con el propósito de identificar componentes de las rutas centrales de C y N cuya concentración intracelular varíe de modo significativo entre estas cepas; establecer correlaciones entre los componentes identificados y su pertenencia a rutas metabólicas específicas; diagramar posibles relaciones con los cambios en el proteoma; y finalmente intentar describir una situación bioquímica que se ajuste a las evidencias disponibles e indique los cambios que operan en la biología de *E. meliloti* en ausencia/presencia de SMc02366.

6.2. Resultados y discusión

6.2.1. Diseño experimental e identificación de metabolitos intracelulares por GC/MS-MS

Con el objetivo avanzar en la identificación de las posibles regulaciones de aspectos metabólicos que controle el RR SMc02366 en el marco de la adaptación al estrés ácido, nos propusimos comparar los cambios metabólicos que experimentan Eme wt y Eme Δ RR cuando se los cultiva en dos condiciones de pH. Para ello, nuestro diseño experimental consistió en analizar metabolitos intracelulares obtenidos de cultivos *batch* de Eme wt y Eme Δ RR en medio GS tamponado a pH neutro y ácido (Figura 6.1). Debido a la variabilidad inherente en la técnica utilizada, decidimos realizar 4 réplicas biológicas para cada cepa y condición de cultivo, y cada cultivo con 4 réplicas técnicas de extracción de metabolitos y derivatización (Barsch *et al.* 2004) (ver Sección 2.11.2, Capítulo 2). Las células fueron cosechadas a una $DO_{600}=0,5\pm0,05$ para enfocar el estudio en un estado metabólico similar al evaluado en los estudios proteómicos detallados en el capítulo anterior. Esto permitiría, en la medida de lo posible, correlacionar los resultados obtenidos por ambas técnicas.

Durante el proceso de extracción de metabolitos (Capítulo 2, Sección 2.11.2) se adicionó ribitol como patrón interno. La utilización de este compuesto que no forma parte del metabolismo de *E. meliloti* como estándar interno se utiliza para tener un valor de referencia entre la señal obtenida por los cromatogramas – área de pico - y la concentración intracelular de los metabolitos, y para independizarse de una posible pérdida de masa al realizar la derivatización de los mismos. Esta última cuestión, se logra normalizando el área de los picos por el mencionado estándar interno. Posteriormente se realiza una segunda normalización por la masa de células de partida en cada caso, para poder realizar comparaciones entre las cepas.

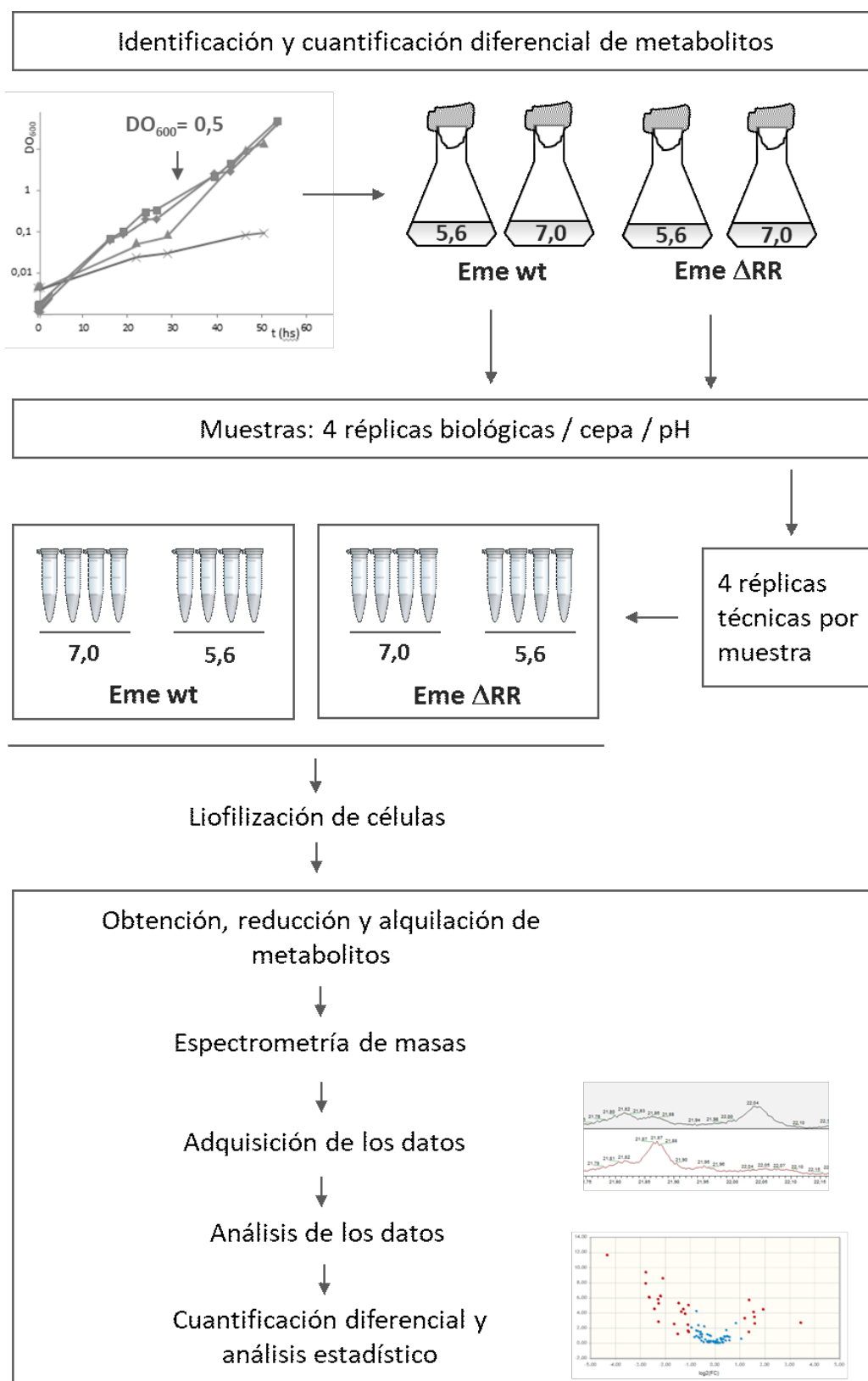


Figura 6. 1. Diseño experimental realizado para la identificación y cuantificación diferencial de metabolitos de Eme wt y Eme Δ RR cultivados en medio ácido o neutro.

Ver detalles en el texto de este capítulo y las cuestiones técnicas en Capítulo 2 (Sección 2.11).

6.2.2. Análisis estadísticos multivariados

En primer lugar los datos se normalizaron para disminuir la tendencia sistemática de los datos (*bias*) y para mejorar la consistencia de ellos, con el fin de poder realizar comparaciones con significado biológico (Xia, 2011). En particular, la distribución normal la logramos al aplicar la raíz cuadrada a los datos y luego dividiéndolos por la raíz cuadrada de la desviación estándar de la media.

Posteriormente, para cada grupo de condiciones, realizamos un análisis de componentes principales (PCA, *Principal Component Analysis*). Este tipo de análisis multivariado toma en consideración todas las variables (metabolitos) en conjunto. De esta manera, con los análisis PCA podemos visualizar el “estado metabólico” de las cepas (salvaje o mutante) en las distintas condiciones (pH=7,0 o pH=5,6). En la Figura 6.2 podemos ver que el análisis PCA separa las células analizadas en dos grupos distintos, indicando que es posible detectar cambios metabólicos entre las cepas en las distintas condiciones. El análisis PCA para Eme wt muestra que los componentes PC1 y PC2 (ejes de los gráficos) pueden explicar el 33,1% de los cambios metabólicos de Eme wt asociados al cultivo en las distintas condiciones, mientras que los componentes PC1 y PC2 de Eme Δ RR en las mismas condiciones explican el 31,8% de los cambios. Los análisis PCA también son útiles para detectar *outliers*, réplicas analíticas con una gran dispersión de datos que se separan de las demás.

A su vez realizamos un análisis PCA de la concentración citosólica normalizada de los metabolitos obtenidos de los cultivos de Eme Δ RR vs. Eme wt en la misma condición, para evaluar los posibles cambios metabólicos asociados a la mutación SMc02366 en ausencia del factor de estrés. Encontramos que el análisis PCA, no logra realizar una separación de los metabolitos de estas cepas en dos conjuntos distantes en la dimensión PC1 vs PC2 (visualización gráfica no mostrada). Estos resultados sugieren que el RR SMc02366 no modificaría – al menos bajo las limitaciones de nuestro análisis - el estado metabólico de *E. meliloti* en ausencia de estrés ácido. Esta observación es congruente con lo mostrado en el Capítulo 4, donde no observamos cambios significativos en la velocidad de crecimiento de Eme Δ RR vs. Eme wt a pH neutro (Figura 4.1, Sección 4.2.2).

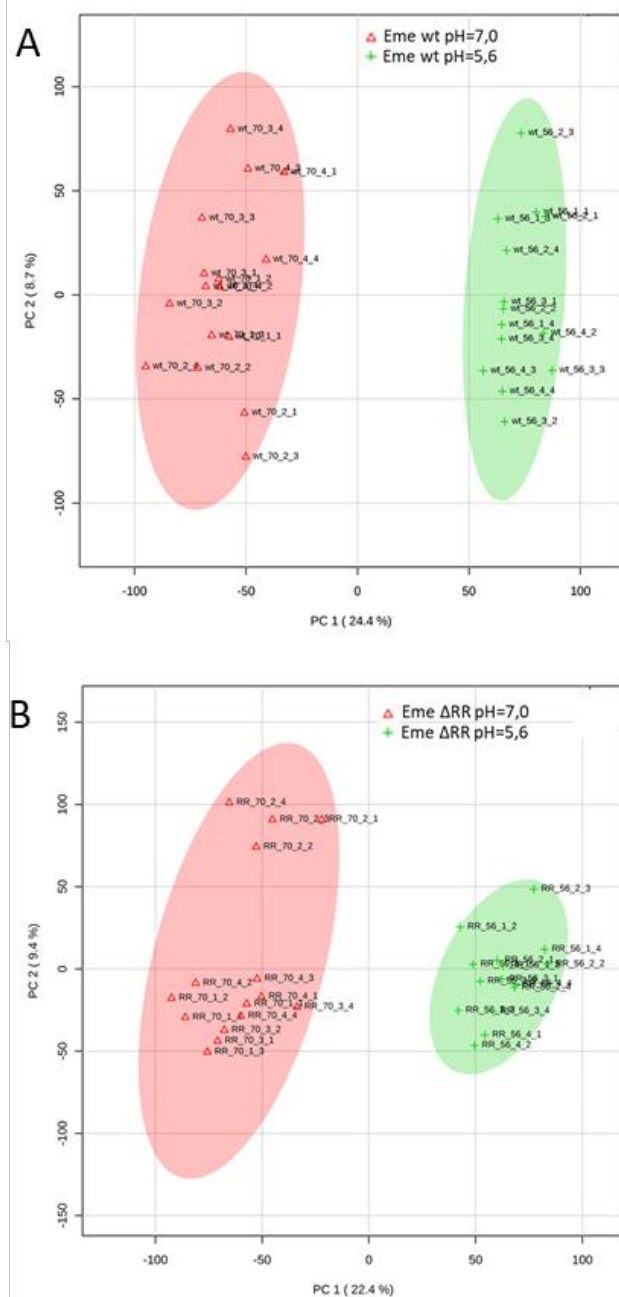


Figura 6. 2. Análisis de componentes principales (PCA) de metabolitos intracelulares de Eme wt y Eme ΔRR cultivadas a pH ácido o neutro.

Metabolitos obtenidos de cultivos de Eme wt (**A**) y Eme ΔRR (**B**) en medio ácido (pH=5,6) o neutro (pH=7,0). PCA que muestra la distribución de metabolitos dentro de la PC1 frente al espacio de variación de PC2. El análisis PCA se realizó sobre la concentración citosólica de cada metabolito normalizado a un peso seco constante de las células y a la señal de una cantidad conocida de ribitol agregado como estándar interno (ver Capítulo 2, sección 2.11). El espacio PC1 (*eje x*) ha permitido separar claramente las muestras de los rizobios cultivados bajo acidez (pH 5,6) de las correspondientes muestras de los rizobios cultivados a pH 7,0. Las áreas coloreadas en rosa y verde que rodean los puntos de datos representan límites de confianza del 95%.

En relación a la forma de visualización del análisis multivariado de datos, el mapa de calor (*heatmap*), a diferencia del análisis por PCA, permite visualizar la concentración relativa de todos los metabolitos evaluados para cada réplica analítica. En las Figuras 6.3 y 6.4 mostramos el análisis de tipo *heatmap* de los metabolitos identificados y cuantificados en células de Eme wt y Eme ΔRR cultivados a diferentes pH. Los dendrogramas (agrupamiento que se observa en los extremos superior e izquierdo de los *heatmaps*) y las imágenes en color se produjeron con el *Software* MetaboAnalyst.

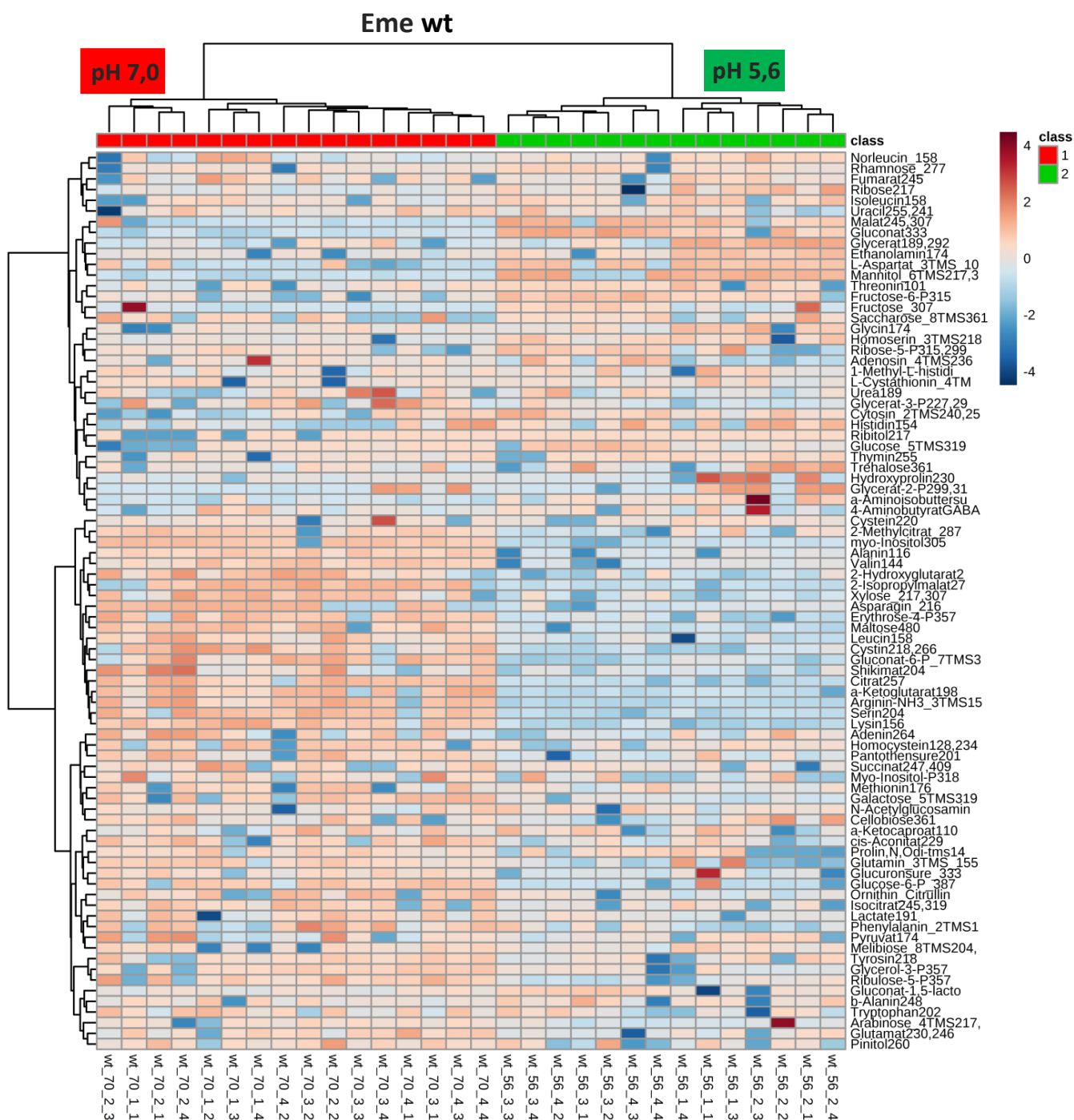


Figura 6. 3. Análisis de tipo *heatmap* de los metabolitos identificados y cuantificados en células de Eme wt cultivadas a diferentes pHs.

Se agrupan y visualizan los datos del metaboloma de rizobios cultivados a diferentes pH: neutro (rojo) y ácido (verde). Cada metabolito está representado por una sola fila de rectángulos de colores, mientras que cada muestra de rizobios cultivado al pH indicado (4 réplicas técnicas/muestra) está representado por una columna única. Los dendrogramas y las imágenes en color se produjeron con el *Software* MetaboAnalyst. La escala de colores indica el cambio “*fold change*” (FC) con respecto al valor promedio sobre las dos condiciones de pH para cada metabolito específico (gama de rojos: valores más altos que la media; gama de azules: valores menores que la media).

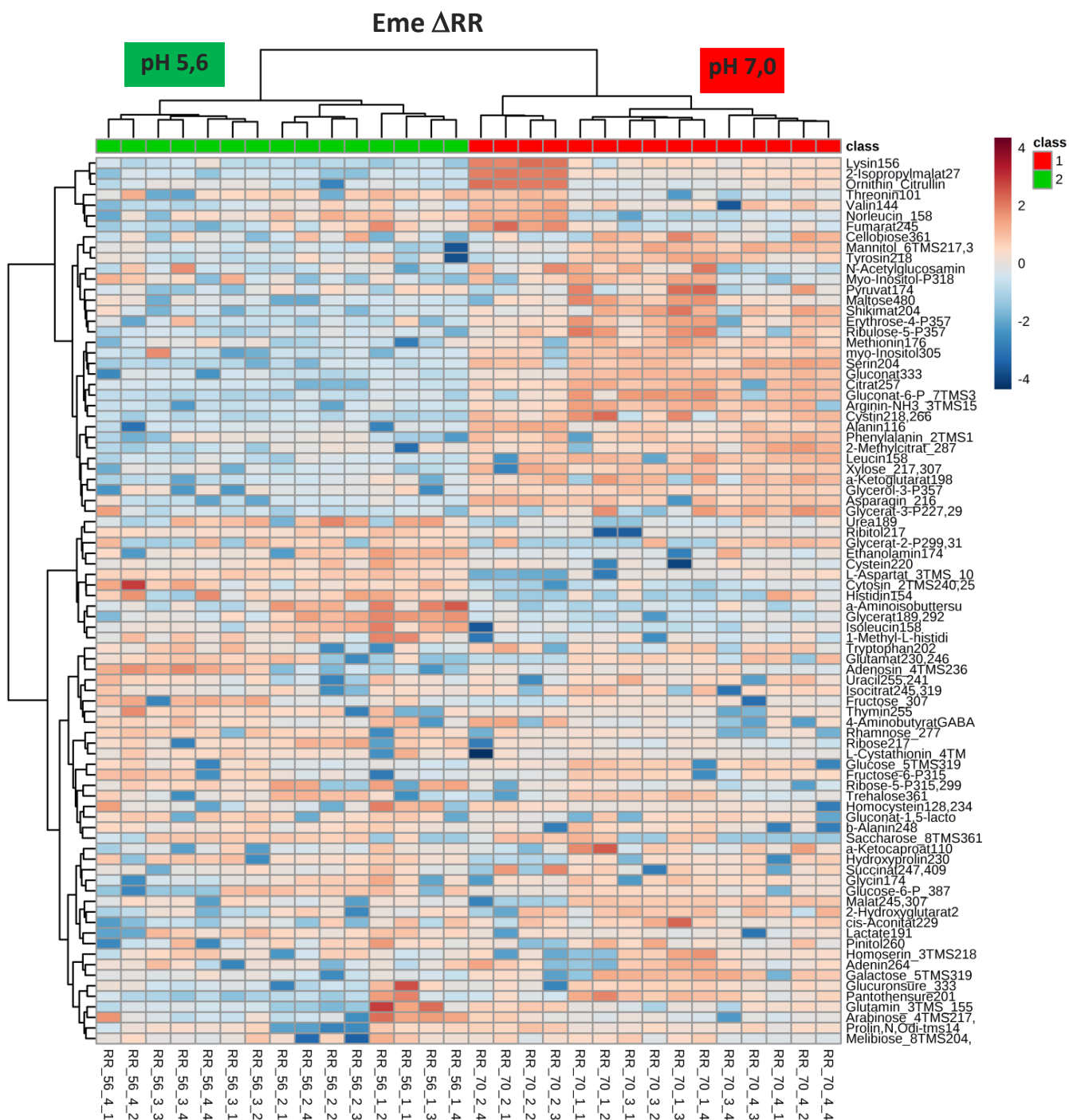


Figura 6. 4. Análisis de tipo *heatmap* de los metabolitos identificados y cuantificados en células de Eme Δ RR cultivadas a diferentes pHs.

Se agrupan y visualizan los datos del metaboloma de rizobios cultivados a diferentes pHs: neutro (rojo) y ácido (verde). Cada metabolito está representado por una sola fila de rectángulos de colores, mientras que cada muestra de rizobios cultivado al pH indicado (4 réplicas técnicas/muestra) está representado por una columna única. Los dendrogramas y las imágenes en color se produjeron con el *Software* MetaboAnalyst. La escala de colores indica el cambio “*fold change*” con respecto al valor promedio sobre las dos condiciones de pH para cada metabolito específico (gama de rojos: valores más altos que la media; gama de azules: valores menores que la media).

6.2.3. Análisis estadísticos univariados

En los estudios metabolómicos, la mayor parte de la diferencia de concentración de los metabolitos corresponde a fluctuaciones inherentes a la fisiología de la célula o a la técnica utilizada, y solo una pequeña parte se la puede asociar a la condición de estudio (en nuestro caso, metabolitos cuya diferencia de concentración se deba a la ausencia del RR SMC02366 y se pongan en evidencia en la tolerancia a la acidez). Con el objetivo de identificar cuáles son esos metabolitos, realizamos un enfoque estadístico univariado donde el análisis se realiza para cada metabolito de manera individual. Evaluamos entonces las proporciones de cambio (*fold change*, FC) y la significancia estadística de ellos aplicando un análisis *t-student*. Como criterio de identificación de metabolitos diferenciados, consideraremos aquellos que disminuyen o aumentan su concentración en al menos dos veces ($-2 < FC < 2$) con un valor- $p < 0,1$.

La comparación de los metabolitos identificados en cada cepa en condiciones ácidas frente a condiciones neutras (Tabla 6.1 y Tabla 6.2), brinda información acerca de los cambios intracelulares que experimenta el metabolismo de estos rizobios cuando las células son cultivadas en condiciones ácidas.

La comparación de los metabolitos identificados en cada cepa y condición será indicativa de los metabolitos que ven alterada su concentración por la ausencia/presencia del regulador SMC02366. Con el propósito de centrar el análisis en aquellos metabolitos asociados directamente a la presencia de RR SMC02366 en condiciones ácidas, realizamos un análisis sustractivo entre la información de las Tablas 6.1 y 6.2 (Tabla 6.3).

Tabla 6. 1. Metabolitos diferencialmente representados en cultivos de Eme wt a pH ácido (pH= 5,6) con respecto a Eme wt pH= 7,0

Metabolito	FC	valor p
2-aminoisobutirato	8,4	$3,3 \times 10^{-4}$
Mio-inositol	4,6	$1,0 \times 10^{-6}$
Manitol	4	$2,4 \times 10^{-6}$
L-Aspartato	3,2	$1,2 \times 10^{-4}$
Glicerato	2,8	5×10^{-3}
Malato	2,8	$1,7 \times 10^{-4}$
Glicerato-3-P	2,7	$8,2 \times 10^{-2}$
Gluconato	2,6	4×10^{-6}
Fructosa-6-P	2,3	8×10^{-4}
Alanina	2,1	$7,5 \times 10^{-5}$
Histidina	2	0,066
Ribulosa-5-P	-2	$3,8 \times 10^{-3}$

Tabla 6.1. Continuación

Metabolito	FC	valor p
Glucosa-6-P	-2,4	$1,2 \times 10^{-4}$
Valina	-2,5	$1,7 \times 10^{-5}$
Maltosa	-2,7	$1,0 \times 10^{-5}$
Asparagina	-3,1	$3,7 \times 10^{-4}$
Arginina	-4,2	$8,4 \times 10^{-9}$
2-cetoglutarato	-4,6	$8,2 \times 10^{-7}$
Eritrosa-4-P	-4,6	$4,2 \times 10^{-6}$
2-isopropilmalato	-4,8	$8,9 \times 10^{-6}$
Shikimato	-4,7	2×10^{-3}
2-Hidroxioglutarato	-5,1	$5,8 \times 10^{-5}$
Cistina	-6,4	$1,2 \times 10^{-6}$
Serina	-6,8	$3,3 \times 10^{-8}$
Citrato	-7	8×10^{-10}
Gluconato-6-P	-7,5	$5,7 \times 10^{-7}$
Lisina	-19	5×10^{-12}

Tabla 6. 2. Metabolitos diferencialmente representados en cultivos de Eme Δ RR a pH ácido (pH= 5,6) con respecto a Eme Δ RR pH= 7,0.

Metabolito	FC	valor p
2-aminoisobutirato	5,9	$3,6 \times 10^{-4}$
Glicerato	4,3	$7,8 \times 10^{-4}$
Urea	3,3	0,014
Histidina	3,2	$2,6 \times 10^{-4}$
L-aspartato	2,1	$2,6 \times 10^{-4}$
Manitol	-1,9	$2,7 \times 10^{-5}$
2-hidroxioglutarato	-2	0,046
Alanina	-2	$1,1 \times 10^{-5}$
2-metilcitrato	-2,2	$6,3 \times 10^{-4}$
Metionina	-2,4	$1,9 \times 10^{-4}$
Eritrosa-4-P	-2,5	$3,4 \times 10^{-4}$
Mio-Inositol	-2,6	$2,6 \times 10^{-5}$
Gluconato	-2,7	$5,5 \times 10^{-8}$
Maltosa	-2,8	$4,9 \times 10^{-4}$
Fenilalanina	-2,9	$4,2 \times 10^{-3}$
Glicerato-3-P	-3,2	4×10^{-3}
2-cetoglutarato	-3,2	$8,2 \times 10^{-5}$
Asparagina	-3,3	$5,2 \times 10^{-5}$
Arginina-NH ₃	-3,6	$4,1 \times 10^{-7}$
Ribulosa-5-P	-4	$1,1 \times 10^{-4}$
Citrato	-4,8	$2,4 \times 10^{-6}$
Shikimato	-4,8	$1,2 \times 10^{-5}$
Serina	-6,5	$6,3 \times 10^{-10}$
Cistina	-7,3	$3,4 \times 10^{-8}$
2-isopropilmalato	-7,3	$4,8 \times 10^{-7}$
Gluconato-6-P	-17	$3,7 \times 10^{-6}$
Lisina	-24	$9,0 \times 10^{-7}$

Tabla 6. 3 Metabolitos diferencialmente representados en cultivos a pH ácido (pH= 5,6) de Eme Δ RR con respecto a Eme wt, cuyos cambios en condiciones ácidas están relacionados a la presencia del RR SMc02366

Metabolito	FC
Urea	3,3
2-Hidroxiglutarato	3,2
Glucosa-6-P	2,5
Citrato	2,2
Eritrosa-4-P	2,1
Mio-inositol	2
Ribulosa-5-P	-2
Fructosa-6-P	-2,3
Metionina	-2,4
2-isopropilmalato	-2,5
2-aminoisobutirato	-2,5
Fenilalanina	-2,8
Malato	-2,8
Gluconato	-5,4
Lisina	-5,6
Manitol	-5,8
Gluconato-6-P	-9,7

Como puede observarse en las Tablas 6.1, 6.2 y 6.3, hemos detectado variación cuantitativa (al nivel de significación $p=0,1$) en una serie de intermediarios del metabolismo del carbono y del nitrógeno, entre células de Eme Δ RR y Eme wt en cultivos de medio GS a pH neutro y ácido. De un total de 91 metabolitos inicialmente analizados, hemos obtenido diferencias significativas para aproximadamente 30% de ellos entre la condición de cultivo neutra y ácida de Eme wt, y un 29% en la condición neutra y ácida de Eme Δ RR. Las variaciones en concentración de los metabolitos que hemos medido han llegado hasta aumentos de más de 8 veces y disminuciones de más de 27 veces entre las condiciones ensayadas.

Al realizar el mismo tipo de análisis univariado sobre los metabolitos obtenidos de ambas cepas cultivadas en condiciones neutras, se hallaron cinco metabolitos diferenciales, cuyas diferencias se encontraron cercanas al valor de corte. Este resultado sugiere la posible actividad de RR SMc02366 en regular la concentración intracelular de dichos metabolitos.

Continuaremos centrando el análisis en la comparación de células Eme wt y Eme Δ RR crecidas en las dos condiciones de acidez que, como dijimos, la aproximación estadística multivariada por PCA indicó cambios fisiológicos significativos (Figura 6.2).

A partir de los resultados obtenidos y teniendo en cuenta los cambios proteómicos detectados, a continuación se discuten algunos de los resultados asociados al metabolismo del carbono.

6.2.4 Vías metabólicas del carbono, de las pentosas fosfato y ciclo de los ácidos tricarboxílicos

En esta sección haremos referencia sobre los cambios encontrados en los intermediarios de las reacciones bioquímicas que se llevan a cabo en las principales vías metabólicas de *E. meliloti* como Entner–Doudoroff (ED), ciclo de ácidos tricarboxílicos (TCA, *TriCarboxylic Acids*) y vía de las pentosas fosfato (PP, *Pentose-Phosphate*). La Figura 6.5 muestra un esquema que relaciona compuestos intermediarios de las principales vías catabólicas de *E. meliloti* de un modo resumido. Además, en dicha figura se indican recuadrados los metabolitos cuantificados y se compara la abundancia relativa de metabolitos citosólicos obtenidos de células de Eme Δ RR cultivadas en medio mínimo GS pH 5,6 con respecto a metabolitos citosólicos obtenidos de Eme wt en la misma condición. Se resaltan en celeste los metabolitos disminuídos y en rosa los aumentados. Las relaciones entre grupos de metabolitos determinados, con vías metabólicas puntuales y con los niveles de los metabolitos que participan de éstas como sustratos, compuestos intermediarios o productos, serán descriptas en lo que resta de este capítulo.

La glucólisis de las hexosas se lleva a cabo en *E. meliloti* mediante la vía ED (Stowers 1985). La vía ED comienza con la metabolización de la glucosa mediante la oxidación de glucosa-6-P a gluconato-6-P en dos pasos, utilizando las enzimas Zwf y Pgl. Alternativamente, la glucosa realiza un *by pass* sobre estas oxidaciones y utiliza una gluconato deshidrogenasa peripásmica (Bernardelli *et al.* 2001) y una gluconato quinasa intracelular (Gosselin *et al.* 2001) que convierte la glucosa primero en gluconato y luego en gluconato-6-P. En este punto, el gluconato-6-P puede continuar su camino oxidativo hasta AcetilCoA (AcCoA) y luego entrar en el TCA o experimentar una descarboxilación para convertirse en ribulosa-5-P y entrar a la vía de las PP.

En particular, observamos que en condiciones de acidez existe una disminución en las concentraciones de gluconato (FC= -5,7) y gluconato-6-P (FC= -13,7) de Eme Δ RR respecto de los valores de Eme wt. Esto podría indicar una menor tasa de generación de energía por la vía ED y/o una menor generación de poder reductor por la vía de las PP. La disminución

estas vías podría ser uno de los motivos por el cual esta cepa mutante tiene menor tasa de división celular en medio ácido (Capítulo 4). Para sobrellevar una condición de estrés, el rizobio necesita energía en forma de ATP y poder reductor en forma de NADPH que obtiene a partir de las vías de ED y PP, respectivamente. Esta última observación, ha sido reportada en estudios ómicos relacionados con la adaptación a la acidez que experimenta *E. meliloti* (Draghi *et al.* 2016). Además, observamos un aumento significativo en las concentraciones de las enzimas Pgl y Edd pertenecientes a la vía ED (Capítulo 5, Sección 5.2.3).

Probablemente, ante la disminución de la vía ED, Eme Δ RR aumente los niveles de esta enzima como una respuesta compensatoria. La fructosa proveniente de la hidrólisis de la sacarosa (fuente de carbono del medio GS utilizado) entra en la vía catabólica de ED mediante la conversión de fructosa-6-P a glucosa-6-P por la enzima Pgi. Nuestros estudios muestran una disminución de la concentración intracelular de fructosa-6-P y un aumento de glucosa-6-P. La disminución de Pgi que describimos en los estudios proteómicos, podría ser la responsable de esta diferencia encontrada en la relación de estos metabolitos, ya que la Pgi cataliza una reacción reversible y aún no se han descrito los Km para cada sustrato. La fructosa-6-P podría disminuir por un direccionamiento de fructosa hacia un producto distinto a manitol, ya que este compuesto lo encontramos casi 6 veces más disminuido (ayudado tal vez por la disminución de la enzima MtlK, FC=1,9; valor p= 0,08 de los análisis proteómicos).

La disminución de las vías ED y PP evidenciadas por la disminución correspondiente de gluconato-6-P y ribulosa-5-P, genera una disminución de ATP y de poder reductor necesario para la síntesis de metabolitos secundarios. Por ejemplo, la síntesis de EPSI, que se ha visto que está aumentada en cultivos ácidos de *E. meliloti* (Draghi *et al.* 2016; Hellweg *et al.* 2009), podría estar disminuída.

Un medio alternativo para la generación de energía podría ser la degradación de mioinositol para dar AcCoA y posterior entrada al ciclo TCA. Se ha reportado que en condiciones ácidas *E. meliloti* induce la expresión de los genes del catabolismo de mioinositol (Draghi *et al.* 2016) y la expresión del TCS ExoS/ChvI que controla positivamente estos genes (Hellweg *et al.* 2009). Sin embargo, en nuestros estudios proteómicos comparativos no hemos encontrado estas proteínas diferencialmente expresadas. Resulta interesante estudiar el metabolismo de mioinositol en *E. meliloti* ya que se demostró que existen 2 sistemas de

transporte dependientes de ATP inducibles por este metabolito (Mauchline *et al.* 2006). En vías anabólicas, mioinositol puede actuar como precursor del fosfolípido fosfatidilinositol vía mioinositol-P. Sin embargo, este fosfolípido está presente en muy bajas cantidades en bacterias en general y en rizobios en particular (Sohlenkamp y Geiger 2016).

El glutamato utilizado como fuente de nitrógeno también puede ser utilizado como fuente de carbono. Este aminoácido es catabolizado en el ciclo TCA vía 2-cetoglutarato. Retomaremos la discusión del metabolismo del glutamato en la próxima sección.

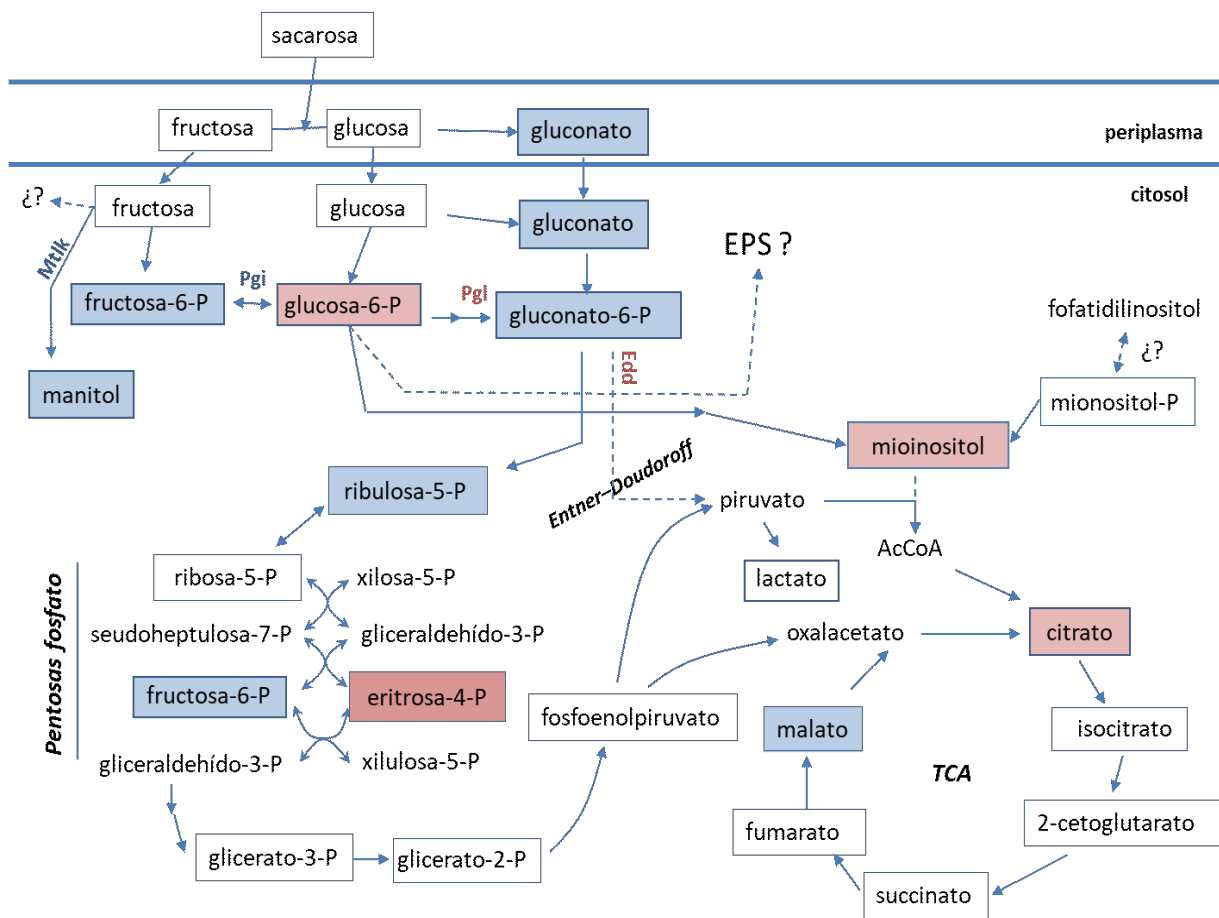


Figura 6. 5. Esquema que relaciona compuestos intermediarios de las principales vías catabólicas de *E. meliloti*.

Se compara la abundancia relativa de metabolitos citosólicos obtenidos de células de Eme ΔRR cultivadas en medio mínimo GS pH 5,6 con respecto a metabolitos citosólicos obtenidos de Eme wt en la misma condición. Todos los metabolitos recuadrados corresponden a metabolitos analizados por GC-MS. Se colorearon en rosa los metabolitos significativamente aumentados y en celeste los significativamente disminuídos. Además, con el mismo código de colores se hace referencia a enzimas detectadas en el ensayo proteómico detallado en el Capítulo 5. Las flechas continuas indican reacciones en un paso, mientras que las flechas discontinuas indican vías metabólicas que involucran dos o más pasos. TCA: ciclo de los ácidos tricarboxílicos; EPS, exopolisacáridos.

6.2.4. Modificaciones en las proporciones de aminoácidos encontrados en el citosol de células de Eme Δ RR cultivadas en medio ácido

El análisis de la abundancia relativa de metabolitos citosólicos obtenidos de células de Eme Δ RR cultivadas en medio mínimo GS pH 5,6 con respecto a metabolitos citosólicos obtenidos de Eme wt en la misma condición permitió detectar cambios en la proporción de aminoácidos intracelulares. En particular, observamos una disminución significativa en la concentración intracelular de lisina, fenilalanina, y metionina.

En la Figura 6.6 esquematizamos las vías síntesis de estos metabolitos y demás aspectos vinculados a estas vías. En esta sección discutiremos algunos aspectos de estos cambios detectados.

En primer lugar, en la Figura 6.6 mostramos sin cambios la concentración de glutamato y una disminución significativa de malato. Sorprendentemente, análisis estadísticos univariados realizados en células de Eme Δ RR cultivadas a pH=7,0 en relación a células Eme wt cultivadas en la misma condición, permitieron evidenciar un aumento simultáneo de glutamato (FC= 2,5; valor-p= 2×10^{-4}) y malato (FC=2,6; valor-p= 9×10^{-4}). Posiblemente, en ausencia de acidez, Eme Δ RR obtenga energía a partir del catabolismo del glutamato; mientras que en medio ácido la utilización de este aminoácido para sintetizar 2-hidroxiglutarato podría generar un detrimento en la obtención de ATP por medio de la vía TCA. Estas evidencias nos proponen que SMC02366 jugaría un papel importante en aspectos del metabolismo central del carbono, y que tales vínculos aumentarían su relevancia metabólica en condiciones ácidas (disminución de la vía ED mostrada en la sección anterior). A su vez podemos pensar que en células Eme Δ RR ante la ausencia de fenotipos de tolerancia controlados por SMC02366, ocurra un direccionamiento de la utilización de glutamato hacia 2-hidroxiglutarato mediante alguna vía metabólica compensatoria. Sin embargo, el direccionamiento de glutamato hacia 2-hidroxiglutarato genera un gran interrogante ya que la base datos KEEG (la cual contiene predicciones de las ruta metabólicas basada en la secuencias anotadas del genoma) nos indica que la enzima que cataliza la conversión de 2-cetoglutarato a 2-hidroxiglutarato no estaría presente en *E. meliloti*.

El desarrollo del fenotipo de adaptación al estrés ácido que llevan a cabo las bacterias neutrófilas, se centra en el mantenimiento del pH_i en valores cercanos a la neutralidad. Principalmente, la célula utiliza reacciones bioquímicas para el consumo de protones; o para

la generación de iones amonio (NH_4^+), que establece un equilibrio ácido base entre protones y amoníaco (NH_3). Estas reacciones citosólicas están catalizadas por descarboxilasas en el primer caso; y por deaminasas y ureasas, en el segundo caso (Lund *et al.* 2014). Las descarboxilasas constituyen un gran grupo de enzimas que llevan a cabo la descarboxilación específica de aminoácidos (o intermediarios), proceso que tiene aparejado el consumo de un protón. La mayoría de las descarboxilasas están vinculadas funcionalmente a proteínas de membrana que permiten la entrada de sustrato; la salida de los productos; o una combinación de ambos, en sistemas antiporter (Kanjee y Houry 2013). En cuanto a reacciones que generan NH_4^+ , además de las deaminasas ciertas bacterias poseen la capacidad de degradar urea en dos moléculas de amoníaco (NH_3) y una de CO_2 por medio enzimas ureasas (Mobley *et al.* 1995). Algunos cambios en los niveles de aminoácidos encontrados en Eme ΔRR lo podemos explicar en términos de aminosas y descarboxilasas asociadas en sus vías de biosíntesis, que podrían ser utilizadas por este tipo celular como un mecanismo directo o indirecto para restituir el pHi a valores normales.

En enterobacterias, está ampliamente descripto el sistema GABA/glutamato como un mecanismo de tolerancia a la acidez (Bearson *et al.* 2009). El sistema consiste en la descarboxilación de glutamato para dar γ -aminobutirato (GABA) y consumir un protón intracelular por una glutamato descarboxilasa. Posteriormente, un canal antiporter expulsa al exterior celular el GABA generado al mismo tiempo que restituye los niveles de glutamato para recomenzar el ciclo. En nuestros análisis metabolómicos, glutamato y GABA formaron parte del conjunto de metabolitos analizados (Capítulo 2, Tabla 2.5) y no mostraron diferencias significativas en los rizobios salvaje y mutante crecidos a $\text{pH}=7,0$ o $\text{pH}=5,6$. De todas formas, *E. meliloti* no utilizaría un sistema GABA/glutamato como mecanismo de homeostasis del pHi ya que esta enzima está ausente en su genoma.

No descartamos, sin embargo, que otras descarboxilasas cumplan un rol activo en el mantenimiento del pHi en Eme ΔRR . Por ejemplo, la descarboxilasa LysA cataliza la descarboxilación 2,6-diaminopimelato en la última reacción biosíntesis de lisina (Dunn 2015). Probablemente, la disminución de la concentración intracelular de lisina de casi 6 veces que detectamos en células de Eme ΔRR podría ser debido a que el RR SMc02366 regule la transcripción de *lysA*, o de otros genes que codifican para enzimas que actúan en reacciones anteriores a esta. Esta hipótesis reviste importancia además por ser LysA la única

descarboxilasa presente en *E. meliloti* 2011 en vías metabólicas de aminoácidos que encontramos al realizar una búsqueda exhaustiva de este tipo de enzimas (EC. 4.1.1.-) en la base de datos KEEG.

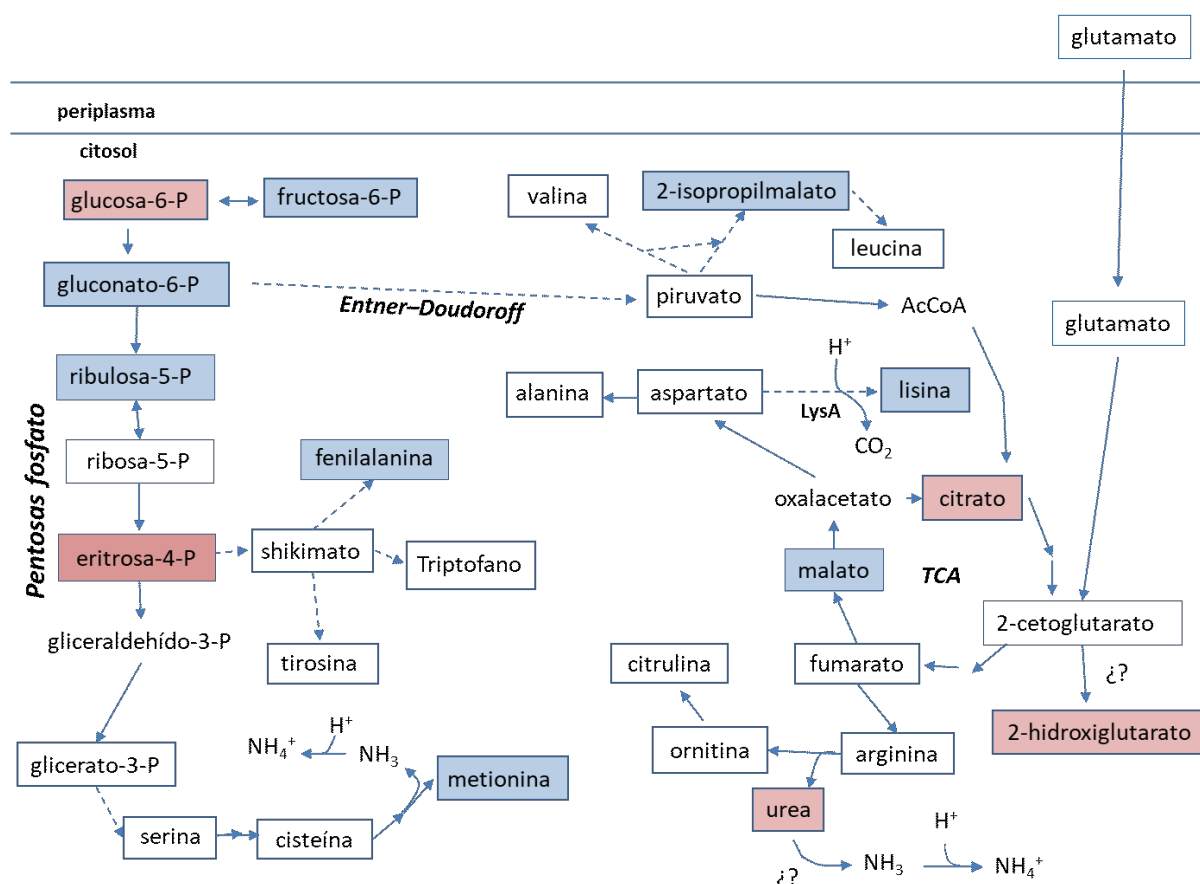


Figura 6. 6 Esquema que relaciona las principales vías de síntesis y degradación de aminoácidos y metabolitos relacionados presentes en *E. meliloti* 2011 y los posibles cambios detectados en células de Eme ΔRR cultivadas en acidez.

Se compara la abundancia relativa de metabolitos citosólicos obtenidos de células de Eme ΔRR cultivadas en medio mínimo GS pH 5,6 con respecto a metabolitos citosólicos obtenidos de Eme wt en la misma condición. Todos los metabolitos recuadrados corresponden a metabolitos analizados por GC-MS. Se colorearon en rosa los metabolitos significativamente aumentados y en celeste los significativamente disminuídos. Las flechas continuas indican reacciones en un paso, mientras que las flechas discontinuas indican vías metabólicas que involucran dos o más pasos. TCA: ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

Es posible que *E. meliloti* utilice la vía de síntesis de ciertos aminoácidos para la producción metabólica de ácidos y bases como un componente específico del mecanismo de homeostasis del pH. El análisis univariado de metabolitos diferenciales de Eme RR vs Eme wt indicaron una disminución relativa de lisina de 2 y 5,6 veces cuando las células fueron cultivadas a pH neutro y ácido respectivamente. El RR SMc02366 podría ejercer en *E. meliloti*

una regulación positiva de la síntesis de lisina, que en condiciones ácidas podría estar exacerbada.

En el mismo sentido, es posible que la actividad de LysA para elevar el pH_i compense la disminución de NH₃/NH₄⁺ relacionada con el aumento de urea y la disminución de la deaminación de cistationina para dar metionina, que ocurre en la segunda etapa de la síntesis de este aminoácido a partir de serina (Ferla y Patrick 2014).

La generación de NH₃ a partir de urea es utilizado por ciertas bacterias como *Helicobacter pylori* para desarrollar un fenotipo de tolerancia a la acidez del medio extracelular. En efecto, se ha descrito que esta bacteria aumenta la expresión del *cluster* de genes de la ureasa en respuesta a la acidez del medio mediante el TCS ArsR/ArsS (Müller *et al.* 2009; Pflock *et al.* 2006). Sin embargo, se ha reportado que ante la exposición a condiciones ácidas, *E. meliloti* no aumenta la transcripción de los genes que codifican para la ureasa (Hellweg *et al.* 2009) e incluso su actividad enzimática disminuye en células que desarrollaron un fenotipo ATR⁺ (Draghi *et al.* 2017). Esto sugiere que la generación de NH₃ a partir de urea para aumentar el pH_i ante condiciones de acidez extracelulares no sería un mecanismo operativo en *E. meliloti* (aún no ha sido dilucidado el rol del ciclo de la urea en rizobios). Más allá del funcionamiento completo o incompleto del ciclo de la urea en *E. meliloti* debe tenerse en cuenta que varias de las enzimas del mismo están ligadas a la biosíntesis de arginina, a través de la conversión glutamato-ornitina-arginina. Deberá abordarse el estudio de mutantes (y/o cuantificación de la expresión génica) en la ureasa y en enzimas del ciclo para indagar la relevancia de tales actividades enzimáticas en la fisiología de *E. meliloti* a bajo pH y su conexión con SMc02366.

Los cambios cuantitativos observados, entre células de Eme ΔRR y Eme wt cultivadas a pH ácido, en ciertos aminoácidos podrían generar alteraciones en el fenotipo simbiótico, ya que muchos trabajos mutacionales de genes que codifican para enzimas involucradas en la biosíntesis de fenilalanina, lisina y metionina indican que estos aminoácidos son necesarios para la correcta interacción con la planta huésped. Por ejemplo, la metionina puede ser generada a partir de aminoácidos precursores como aspartato o cisteína. En *E. meliloti* se ha visto que la ausencia de *metA*, que codifica una enzima interviene en la síntesis de metionina a partir de aspartato, genera un retraso en la nodulación y es deficiente para la competición por la nodulación de *M. sativa* (Abbas *et al.* 2002; Pobigaylo *et al.* 2008).

Entre los aminoácidos aromáticos evaluados, encontramos una disminución en la concentración de fenilalanina. La biosíntesis de fenilalanina comienza con la condensación catalizada por AroF de eritrosa-4-fosfato y fosfoenolpiruvato para formar ácido 3-deoxi D-arabinoheptulosónico-7-fosfato (DAHP) y continúa a través de la vía del shikimato para formar prefenato. Mutantes *aroF* de *E. meliloti* generados por transposición y no caracterizados genéticamente, desarrollaron nódulos (fenotipo Nod⁺) pero no fueron efectivos en la fijación de nitrógeno (fenotipo Fix⁻) en plantas de alfalfa (Jelesko *et al.* 1993). No está claro aún si *aroF* fue el gen alterado en los mutantes dado que en *E. meliloti* este gen es de copia única y sorprendentemente se detectó actividad DAHP sintetasa residual en los mutantes. En rizobios, la ruta del catabolismo de fenilalanina no ha sido establecida. En *E. meliloti*, este aminoácido se usa como fuente de nitrógeno pero no como fuente de carbono, y en condiciones limitantes de nitrógeno la fenilalanina se convierte en tirosina (Milcamps y de Bruijn 1999).

6.3. Conclusiones

En este capítulo avanzamos en la caracterización de los cambios metabólicos asociados al RR SMC02366 en la tolerancia al estrés ácido. Para ello, utilizando GC/MS-MS, evaluamos la concentración intracelular relativa de aproximadamente 90 metabolitos intracelulares de Eme Δ RR con respecto a Eme wt cultivadas en medio ácido. Los metabolitos evaluados constituyen intermediarios de diversas rutas metabólicas que acontecen en *E. meliloti*. Se detectaron 17 metabolitos con concentraciones alteradas en 2 o más veces. Hemos podido asociar estos hallazgos con rutas metabólicas predichas en bases de datos *on line*. Esto nos brindó un primer paso para comenzar a comprender las bases moleculares asociadas al rol de RR SMC02366 en el fenotipo tolerancia a la acidez que mostramos en el Capítulo 4. Además, hemos podido correlacionar algunos resultados con los obtenidos en los ensayos proteómicos que hemos comentado en el capítulo anterior. **Claramente existe algún tipo de relación entre SMC02366 con el metabolismo del carbono y la síntesis de aminoácidos. Nuestros hallazgos sugieren que SMC02366 podría intervenir en estrategias de control y de acumulación de C y N en la célula.**

La disminución de la vía ED en células de Eme Δ RR cultivadas en medio ácido, implicaría un déficit energético en estos tipos celulares, y podría explicar la variación en la μ de este mutante en condiciones ácidas (Capítulo 4, Sección 4.2.2). Probablemente, el ligero aumento de las proteínas AgIE, Pgl, Edd involucrados en la captación de sacarosa y en las primeras etapas de la vía ED (Capítulo 5), podría ser un mecanismo compensatorio ante la disminución de la mencionada vía catabólica.

Ante la disminución del flujo del carbono por la vía ED, otras vías catabólicas podrían aumentar su importancia, como muestran los valores relativos de glucosa-6-P y mioinositol. **La obtención de energía por medio de vías alternativas, podría tener costos energéticos en la síntesis de metabolitos secundarios como EPSI, que es bien conocido que aumenta cuando *E. meliloti* se expone a condiciones ácidas.** En el mismo sentido, la disminución del poder reductor que encontramos en este mutante (disminución de ribulosa-5-P) probablemente tenga un impacto negativo en la biosíntesis de dicho polisacárido. Dadas las evidencias presentadas, será necesario cuantificar experimentalmente la capacidad que poseen estas células para producir EPSI, ya que este polisacárido posee un rol clave en la

progresión del hilo de infección durante la entrada de *E. meliloti* a la planta (Capítulo 1, Sección 1.5.2).

Resultan interesantes los niveles relativos de glucosa-6-P y fructosa-6-P encontrados. La sacarosa, fuente de carbono del medio GS utilizado, se hidroliza en unidades de glucosa y fructosa; cuyos productos fosforilados (glucosa-6-P y fructosa-6-P) pueden ser interconvertidos por la reacción catalizada por la isomerasa Pgi. Probablemente la disminución de esta enzima (Capítulo 5, Sección 5.2.2) sea el motivo del aumento de glucosa-6-P en detrimento de fructosa-6-P. En este contexto, resultará interesante evaluar la posibilidad que la fructosa se convierta en sorbitol por la reacción de un paso catalizada por la enzima L-iditol 2-dehidrogenasa (codificada por el *locus tag* SMb20856).

Por otro lado, además de identificar cambios en el metabolismo central de Eme Δ RR en medio ácido, detectamos posibles mecanismos referidos a la homeostasis del pH_i intracelular que estarían ausente en este mutante. **Aparentemente, el consumo de protones que se lleva a cabo en la síntesis de lisina (por medio de la descarboxilasa LysA) tendría un papel importante en la homeostasis del pH_i** en términos directos o indirectos. Esto podría relacionado con una compensación de la disminución de NH₃ que proponen conjuntamente el aumento de urea y la disminución de metionina.

La disminución de la concentración de lisina en células Eme Δ RR cultivadas a pH=7,0 con respecto a células Eme wt cultivadas en la misma condición, sugieren que la regulación positiva de SMc02366 en la síntesis de lisina está presente en condiciones de neutralidad, y es más marcada aún en condiciones ácidas.

Dado que encontramos diferencias marcadas en las concentraciones de fenilalanina, lisina y metionina y que ha sido descripta la relevancia de estos aminoácidos en el establecimiento de la simbiosis de *E. meliloti* con *M. sativa*, será importante tener en cuenta el posible control que pueda desplegar el RR SMc02366 sobre las vías de biosíntesis de dichos aminoácidos. Puesto que existen marcadas diferencias en cuanto a la regulación del metabolismo de C y N en los rizobios durante la vida libre respecto a lo que ocurre en los bacteroides simbióticos, la extrapolación del modelo que surge a partir del análisis funcional de SMc02366 en condiciones de vida libre a condiciones de vida simbiótica debe realizarse con mucha precaución. Para poder comprender fenómenos regulatorios vinculados a la vida simbiótica será necesario obtener evidencias adicionales del rol del regulador durante la

interacción de los rizobios con su planta hospedadora. Esta discusión se ampliará en el capítulo siguiente donde analizaremos el fenotipo simbiótico de mutantes en los genes del posible TCS SMc02366/SMc02367.

Impacto de la mutación de
SMc02366 y SMc02367 sobre la
simbiosis entre *E. meliloti* 2011 y
Medicago sativa

Capítulo 7

7.1. Introducción

En condiciones adecuadas, los rizobios son capaces de establecer una simbiosis eficiente con plantas leguminosas. Tal como se ha detallado en el capítulo introductorio de este trabajo, la FBN que se lleva a cabo en el nódulo radicular es el resultado de un complejo diálogo molecular entre los simbioses que involucra varias etapas, las cuales se inician previo al contacto físico entre los rizobios y la raíz - a través del intercambio de señales en la rizósfera - y finalizan con la formación de nódulos radiculares maduros en los que rizobios diferenciados en bacteroides se especializan para llevar a cabo el proceso de FBN.

En *E. meliloti*, han sido descritos algunos TCS que modulan la expresión de genes cuyos productos de expresión están vinculados al proceso simbiótico, como los que median la exportación de succinoglicanos y glicanos cíclicos importantes para el avance de la infección (ExoS/ChvI y FeuP/FeuQ) y los genes *nif* necesarios para la síntesis de la nitrogenasa (FixJ/FixL) (Cheng y Walker 1998; Fischer 1994; Griffitts *et al.* 2008). Sin embargo, el rol de TCS SMc02366/SMc02367 en el proceso simbiótico aún no ha sido evaluado.

En relación al tema de este trabajo, recientemente se ha revelado la presencia de ambientes ácidos a lo largo del proceso de infección. Geddes *et al.* (2014), demostraron la existencia de un ambiente ácido durante el inicio de las infecciones en el hilo de infección en *M. sativa*. Asimismo, Pierre *et al.* (2013) demostraron la presencia de un ambiente ácido en etapas más avanzadas de la simbiosis, particularmente en el espacio peribacteroidal dentro de la zona III de los nódulos fijadores de N₂. Como ya hemos mencionado, los nódulos de tipo indeterminado exhiben una zonificación espacial que corresponde a etapas sucesivas de desarrollo (Capítulo 1, Sección 1.5.5).

Durante el transcurso de este trabajo, Roux y colaboradores utilizaron la secuenciación de ARNm de alta profundidad acoplada a la microdissección láser de las regiones de nódulos a fin de obtener los perfiles transcriptómicos en diferentes estadios de diferenciación de *E. meliloti* dentro del nódulo de *M. truncatula*. Estos autores reportaron tanto en la zona II como en la zona III la sobreexpresión de SMc02366 y SMc02367 (Roux *et al.* 2014).

En paralelo, también mediante ensayos transcriptómicos, en nuestro grupo se detectó una mayor expresión de SMc02366 (entre otros genes que codifican para factores transcripcionales) cuando se analizó ARNm obtenido de *E. meliloti* cultivado en un

quimiostato a pH 6,1 en comparación con el de un cultivo a pH neutro (Draghi *et al.* 2016). Considerando además el fenotipo alterado de tolerancia a la acidez que presentan los cultivos de Eme Δ RR y Eme Δ HK¹ a pH 5,6 (Capítulo 4, Sección 4.2.5), es posible que el TCS SMC02366/SMC02367 juegue algún rol en la respuesta al bajo pH extracelular en la planta.

Los aspectos mencionados, representan un recurso valioso para abordar una variedad de cuestiones relacionadas al proceso de diferenciación y a la interacción planta-bacteria. Los mismos permiten hipotetizar una posible conexión entre los niveles de expresión de estas proteínas, la actividad fijadora de nitrógeno de los nódulos y su eficiencia simbiótica. En este contexto, nos propusimos evaluar el fenotipo simbiótico de los mutantes y realizar la caracterización morfológica utilizando microscopía óptica, microscopía electrónica de transmisión, y microscopía confocal de los nódulos generados por los mutantes en los componentes del TCS en estudio.

7.2. Resultados y Discusión

7.2.1. Determinación del impacto de la mutación en SMC02366 y SMC02367 sobre etapas tempranas de la interacción *E. meliloti* - *M. sativa*

Según hemos indicado en la introducción, la simbiosis entre rizobios y leguminosas constituye una asociación que es el resultado de una compleja serie de procesos a lo largo de los cuales se producen cambios fisiológicos en ambos simbioses, que culmina con la formación de nódulos radiculares maduros fijadores de nitrógeno atmosférico, cuyo número está cuidadosamente controlado (limitado) por la planta. Aquellos rizobios que logren alcanzar la raíz y colonizarla (los más competitivos) serán los que mayoritariamente infecten la raíz y posteriormente ocupen los nódulos. Con el objetivo de analizar si el TCS SMC02366/SMC02367 está involucrado en la regulación de procesos importantes en etapas pre-infectivas, nos propusimos estudiar la capacidad de los mutantes del sistema de colonizar las raíces de plantas de alfalfa. Se ha propuesto que la adhesión de estas bacterias en los pelos radiculares consta en primera instancia de una adhesión laxa y reversible (que involucra lectinas de la planta y polisacáridos bacterianos), y en segunda instancia de una unión más firme e irreversible a través de la síntesis de fibrillas de celulosa que causan la formación de agregados bacterianos (Downie 2010).

Basándonos en una estrategia previamente puesta a punto en nuestro grupo (Salas *et al.* 2017), realizamos estudios de doble inoculación de cepas para evaluar la colonización de la raíz. Para ello se realizó una co-inoculación del mutante a ensayar con una cepa isogénica de *E. meliloti* 2011 que expresa la proteína verde fluorescente (Eme GFP⁺) (Pistorio *et al.* 2002) en una proporción 1:1 que llamamos “proporción de entrada”. Luego de 3 dpi, las bacterias débilmente unidas se extrajeron (Capítulo 2, Sección 2.12.3) y se plaquearon en medio rico. El recuento relativo de colonias obtenidas de esta forma correspondió a la llamada “proporción de salida”, proporción de la cepa mutante con respecto a Eme GFP⁺. Como control del ensayo, se utilizó un inóculo doble que contenía las cepas *E. meliloti* 2011 salvaje (Eme wt) y Eme GFP⁺ que no presentan diferencias en la colonización de la raíz (Pistorio *et al.* 2002).

Nuestros ensayos indicaron que los valores de las proporciones de entrada y salida de los mutantes no presentan diferencias estadísticamente significativas (Figura 7.1), concluyendo entonces que el sistema de estudio no participaría en la colonización de la raíz de alfalfa.

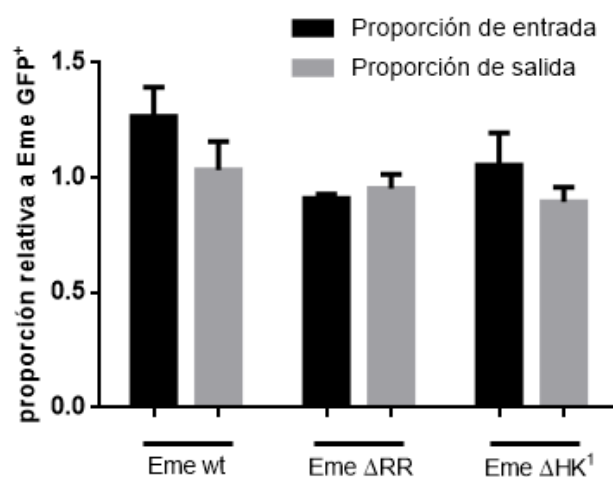


Figura 7. 1. Evaluación de la capacidad de mutantes de *E. meliloti* 2011 para colonizar la raíz de alfalfa en experimentos de competición frente a la cepa salvaje.

Se evalúa el grado de adhesión a la raíz en términos de la diferencia entre la proporción relativa de la cepa a evaluar y *E. meliloti* GFP⁺ en el inóculo inicial (proporción de entrada) y la proporción del recuento de colonias obtenidas de la raíz luego de 3dpi (proporción de salida). Cepas evaluadas: *E. meliloti* 2011 salvaje, Eme wt; y mutantes en genes del posible TCS SMc02366/SMc02367 (Tabla 4.2). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media de tres experimentos independientes.

Además, en ensayos de nodulación en *M. sativa* no hemos observado diferencias significativas, entre el comportamiento de la cepa salvaje y los mutantes. Por ejemplo, la observación de la morfología macroscópica de los nódulos infectados por cepas salvajes y mutantes no arrojó diferencias en relación al tamaño, la forma, ni en los recuentos de los nódulos presentes a los 10 y 20 dpi. Tampoco se observaron diferencias significativas en los

ensayos de competitividad para la ocupación del nódulo en *M. sativa*, ni en el recuento de rizobios viables recuperados de los nódulos (datos no mostrados). Cabe mencionar que estos ensayos se realizaron en una solución mineral para plantas a pH neutro. Resta ensayar cómo se comportan las bacterias cuando los mismos ensayos se realicen utilizando una solución salina para plantas tamponada a pH ácido.

7.2.2. Caracterización de la simbiosis de los mutantes en SMc02366 y SMc02367 de *E. meliloti* 2011 con *Medicago sativa*

En relación a los fenotipos y marcadores moleculares asociados al TCS SMc02366/SMc02367 presentados precedentemente - fenotipo en acidez y en ciertas zonas del nódulo (Roux *et al.* 2014) -, analizamos la eficiencia simbiótica de la asociación midiendo en forma indirecta la actividad de FBN en la planta huésped *Medicago sativa* (alfalfa). Para ello se inocularon plantas de alfalfa con Eme wt y sus mutantes isogénicos. Se determinó el peso seco promedio de la porción aérea de las plantas inoculadas con cada una de las cepas. El análisis de los resultados indicó que la biomasa seca aérea por planta presenta diferencias estadísticamente significativas entre las plantas inoculadas con mutantes en la HK y las inoculadas con la cepa salvaje (Figura 7.2). El mutante Eme ΔRR no presentó diferencias estadísticamente significativas. Es pertinente comentar además que, si bien las plantas inoculadas con los mutantes en la HK desarrollaron menor altura y tallos ligeramente más débiles, exhibieron una coloración foliar y nodular normal. El peso seco de la parte aérea de las plantas sin inocular (control) fue un orden de magnitud menor que el de las plantas inoculadas y este hecho se acompañó con un aspecto clorótico de las plantas control. Nuestros estudios además permiten observar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las plantas inoculadas con los mutantes Eme ΔHK^1 y Eme ΔHK^2 , indicando que el asRNA_1143 no jugaría un rol relevante en la FBN (Figura 7.2).

La diferencia observada en la biomasa seca aérea de plantas inoculadas con cepas mutantes en la HK en comparación a las inoculadas con el mutante Eme ΔRR sugiere que, en simbiosis, la HK SMc02367 podría mediante un mecanismo de *crosstalk* (mecanismo en el cual una HK es capaz de fosforilar a más de un RR) alterar el estado de fosforilación de otro regulador transcripcional capaz de modular la expresión de genes necesarios para avanzar en alguna/s de las etapa/s de la interacción simbiótica.

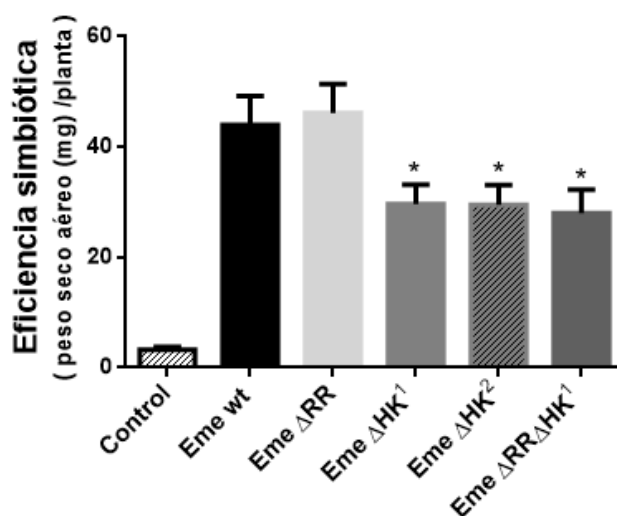


Figura 7. 2. Estimación de la eficiencia simbiótica entre alfalfa y *E. meliloti* 2011 salvaje y los mutantes isogénicos.

Los resultados corresponden al promedio del peso seco de la parte aérea de al menos 30 plantas por condición luego de 35 dpi. Las barras de error corresponden al error estándar de la media (\pm SEM). La significancia estadística corresponde a un análisis ANOVA con una confianza $>95\%$. La figura muestra un ensayo representativo de tres ensayos independientes.

7.2.3. Determinación del impacto de la mutación en SMc02366 y SMc02367 sobre etapas tardías de la interacción *E. meliloti* - *M. sativa*

Una vez colonizada la raíz, la interacción simbiótica continúa mediante la entrada de los rizobios al tejido vegetal y la posterior síntesis y progresión del hilo de infección que direcciona los rizobios hasta las células del córtex. La regulación del proceso infectivo de los rizobios está gobernada por el huésped, que controla el inicio de nuevas infecciones según los requerimientos de nitrógeno (Caetano-Anolles y Gresshoff 1991; Gage 2004).

Los rizobios que logran colonizar la raíz y progresar en la infección de la misma deben modificar su fisiología para tolerar la exposición a las especies reactivas de oxígeno que sintetiza la planta como mecanismo de defensa (Jamet *et al.* 2003; Santos *et al.* 2001), y para expresar los polisacáridos adecuados para la síntesis y progresión del hilo de infección en un ambiente naturalmente ácido (Brewin 2004; Geddes y Oresnik 2014; Jones *et al.* 2007). Una vez liberados en las células del primordio nodular, los rizobios deben adaptarse a la exposición de péptidos antimicrobianos liberados por el huésped (Alunni y Gourion 2016; Haag *et al.* 2013) y tolerar el ambiente ácido que se presenta en espacio peribacteroidal (Pierre *et al.* 2013). El nódulo proporciona el entorno adecuado para que se produzca la FBN.

Tanto la organogénesis como la infección bacteriana son dos procesos distintos y genéticamente separados. Sin embargo, para que la formación del nódulo proceda en el sitio donde se ha producido la infección, ambos procesos deben ser coordinados tanto espacial

como temporalmente (Jones *et al.* 2007; Oldroyd *et al.* 2011). En ese sentido, el desarrollo del nódulo es un proceso que requiere del intercambio de señales entre los simbios, estableciéndose un diálogo molecular cuyo fin es el establecimiento de nuevos patrones morfogenéticos en ambos organismos. Así los rizobios dan inicio al programa de diferenciación a bacteroide (Mergaert *et al.* 2006).

En este contexto, considerando la diferencia en la biomasa seca aérea de plantas inoculadas con cepas mutantes en la HK (descrita en la Sección 7.2.2) y el reporte de la sobreexpresión de SMc02366 y SMc02367 tanto en la zona II como en la zona III del nódulo maduro ocupado por la cepa salvaje (Roux *et al.* 2014), nos propusimos analizar la estructura y ultraestructura de nódulos infectados con las cepas mutantes utilizando microscopía óptica, microscopía electrónica de transmisión y microscopía confocal para evaluar si la mutación de SMc02366 y SMc02367 en rizobios simbios de alfalfa altera la morfología y/o estructura nodular.

7.2.3.1. Análisis morfológico de nódulos de *Medicago sativa* inducidos por *E. meliloti* 2011 salvaje y cepas mutantes

A partir de secciones longitudinales de nódulos de 35 dpi se analizó la histología general de los nódulos ocupados por Eme wt o mutantes en los genes del TCS predicho. En todos los casos, se observó una organización celular y tisular correspondiente a nódulos indeterminados fijadores de nitrógeno (la cual ha sido descrita en el Capítulo 1, Sección 1.5.5). En la Figura 7.3 se muestra un corte longitudinal de un nódulo de *M. sativa* inducido por Eme Δ RR que fue obtenido bajo nuestras condiciones experimentales y observado al microscopio óptico. En la imagen se pueden identificar las 4 zonas típicas: el meristema apical (zona I); la zona de infección (zona II); la zona central con mayor grado de ocupación bacteriana y donde ocurre la fijación de nitrógeno por bacteroides (zona III); y la región proximal (basal) con células vegetales menos ocupadas, correspondiente a una región de senescencia (zona IV) que comienza a diferenciarse a partir de los 30 dpi (Puppo *et al.* 2005). Por fuera de las zonas II-IV, se pueden identificar células del parénquima, haces vasculares, endodermis, y la corteza externa (Figura 7.3).

Las micrografías de secciones de nódulos de plantas de *M. sativa* (cinco semanas post-inoculación) inducidos por las cepas mutantes (Eme Δ HK² y Eme Δ RR) no presentaron diferencias obvias en la estructura en comparación con la generada y descrita para la cepa salvaje.

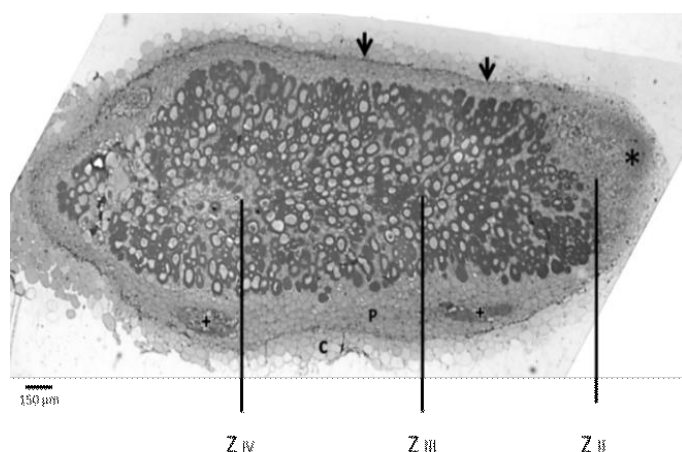


Figura 7. 3. Corte longitudinal semifino de un nódulo de *M. sativa* inducido por *E. meliloti* 2011 mutante en el RR SMc02366.

El corte se realizó en el plano axial de un nódulo obtenido 35 dpi. En la fotografía se indica la zona meristemática (Zona I, *); la zona de infección (Z II); la zona de fijación de nitrógeno (Z III); la región de senescencia (Z IV). Por fuera de esas zonas se distinguen células del parénquima (P); haces vasculares (+); endodermis (flechas); y células del córtex nodular (C).

7.2.3.2. Examinación microscópica a mayor aumento de células simbióticas presentes en la zona III de nódulos de *Medicago sativa* inducidos por *E. meliloti* 2011 salvaje y cepas mutantes

Durante la simbiosis, dos poblaciones diferentes de rizobios se establecen en el nódulo. Una corresponde a un pequeño grupo de bacterias viables indiferenciadas, capaces de reproducirse y de multiplicarse en condiciones de vida libre. La segunda población (mayoritaria) corresponde a la que se ha diferenciado a bacteroides fijadores de N_2 , incapaces de multiplicarse o volver a la forma de vida libre (Oke y Long 1999).

A fin de esclarecer la causa de la diferencia en la biomasa seca aérea de plantas inoculadas con cepas mutantes en la HK (descrita en la Sección 7.2.2) nos propusimos analizar si las mutaciones alteran los niveles de rizobios diferenciados a bacteroides dentro del nódulo maduro. Para ello se exploró la zona III, donde ocurre la FBN, en nódulos ocupados por los rizobios salvaje o mutantes. Se observó que los nódulos infectados por los rizobios mutantes (Figura 7.4.B y 7.4.C) mostraron una menor ocupación por bacteroides que los infectados con *E. meliloti* 2011 salvaje, observándose ese fenotipo con mayor intensidad en nódulos inducidos con el mutante en la HK SMc02367 (Figura 7.4.C). Este hecho sugiere que SMc02366 y SMc02367 son proteínas necesarias para que los rizobios se diferencien a bacteroides.

En los cortes semifinos de la zona III correspondientes a los nódulos infectados con la cepa mutante HK SMc02367 (Figura 7.4.C), también se puede observar la presencia de ciertos

gránulos irregulares dentro de las células vegetales. Según el tamaño, morfología, y la coloración obtenida por la reflexión de la luz podrían corresponder a gránulos de almidón (Renier *et al.* 2011; Vasse *et al.* 1990). Vasse y colaboradores han correlacionado la presencia de este tipo de gránulos en la zona III con una interacción simbiótica no eficiente (Vasse *et al.* 1990). Será necesario a futuro avanzar en la identificación y cuantificación diferencial de este compuesto de reserva.

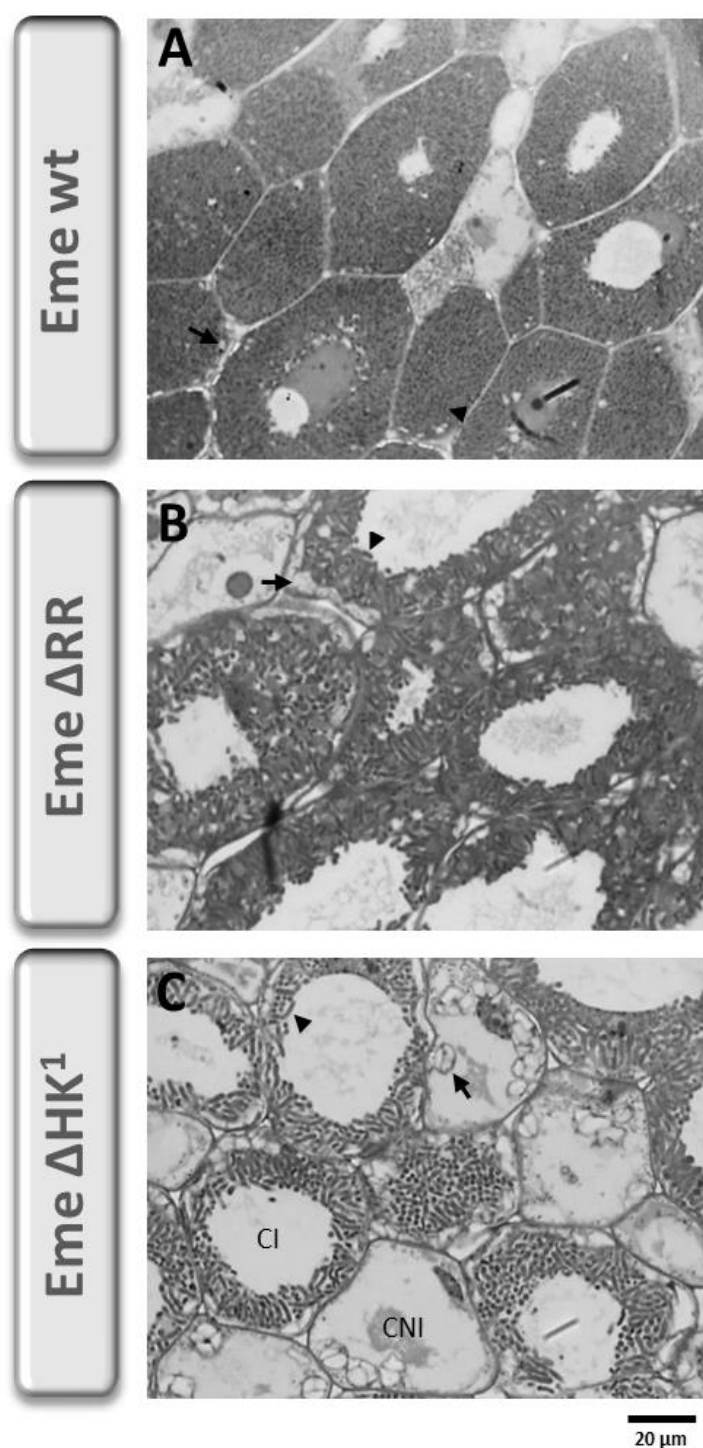


Figura 7. 4. Detalle aumentado de la zona III de nódulos inducidos por *E. meliloti* 2011 salvaje o mutantes.

Las micrografías muestran células de la zona III de nódulos a los 35 dpi. Los mismos fueron inducidos por *E. meliloti* salvaje (Eme wt, panel A) o los mutantes del regulador de respuesta SMc02366 (Eme Δ RR, panel B) y la histidina quinasa SMc02367 (Eme Δ HK¹, panel C). Se indican los bacteroides (cabezas de flecha) y los posibles gránulos de almidón (flechas). CI: célula vegetal infectada. CNI: célula vegetal no infectada. Las micrografías representativas fueron seleccionadas de tres muestras biológicas independientes.

7.2.3.3. Análisis de la ultraestructura de nódulos de *Medicago sativa* inducidos por *E. meliloti* 2011 salvaje y cepas mutantes isogénicas mediante microscopía electrónica de transmisión

Luego que los rizobios son liberados a la zona II del nódulo, son endocitados por las células vegetales dando lugar a simbiosomas (Sección 1.5.3). Dentro del simbiosoma, los rizobios inician un programa de diferenciación celular en respuesta a señales del huésped (Haag *et al.* 2013). Como resultado los rizobios experimentan una diferenciación terminal a bacteroides que poseen el metabolismo energético direccionado hacia la reducción de nitrógeno atmosférico. El éxito de la asociación simbiótica requiere tanto de la actividad concertada de mecanismos del rizobio implicados en los procesos de diferenciación, como del correcto intercambio de nutrientes entre los simbiosomas se lleva a cabo en las paredes celulares del bacteroide y del simbiosoma. Cualquier alteración de estos aspectos, deriva en la senescencia prematura del rizobio y es detrimental para el desarrollo de la planta.

Vasse y colaboradores realizaron un seguimiento de los cambios que acontecen en la diferenciación de los rizobios a bacteroides en el trayecto desde la zona de infección (zona II) hasta el comienzo de la zona de senescencia (zona III-IV) utilizando microscopía electrónica de transmisión (TEM, del inglés *Transmission Electron Microscopy*) (Vasse *et al.* 1990). En particular, estos autores clasificaron los bacteroides de nódulos de *M. sativa* en 5 tipos distintos en términos de: *i*) la localización y el grado de condensación de ácidos nucleicos, y *ii*) la ubicación en el nódulo de estos bacteroides (zonación). Así mismo, caracterizaron la desorganización de la estructura simbiosoma-bacteroide que acontece en procesos infectivos por rizobios mutantes en genes necesarios para la FBN (Vasse *et al.* 1990).

Utilizando estos criterios, nos propusimos evaluar por TEM la ultraestructura de los bacteroides salvaje y mutantes y sus simbiosomas asociados. Pudimos identificar la presencia de bacteroides diferenciados en todos los casos. En células de nódulos inducidos por Eme Δ RR y Eme Δ HK¹ se observó un aumento de la cantidad de estructuras blancas opacas en la periferia celular, probablemente gránulos de reserva; como sugerimos en la sección anterior (Figura 7.5, B1 y C1).

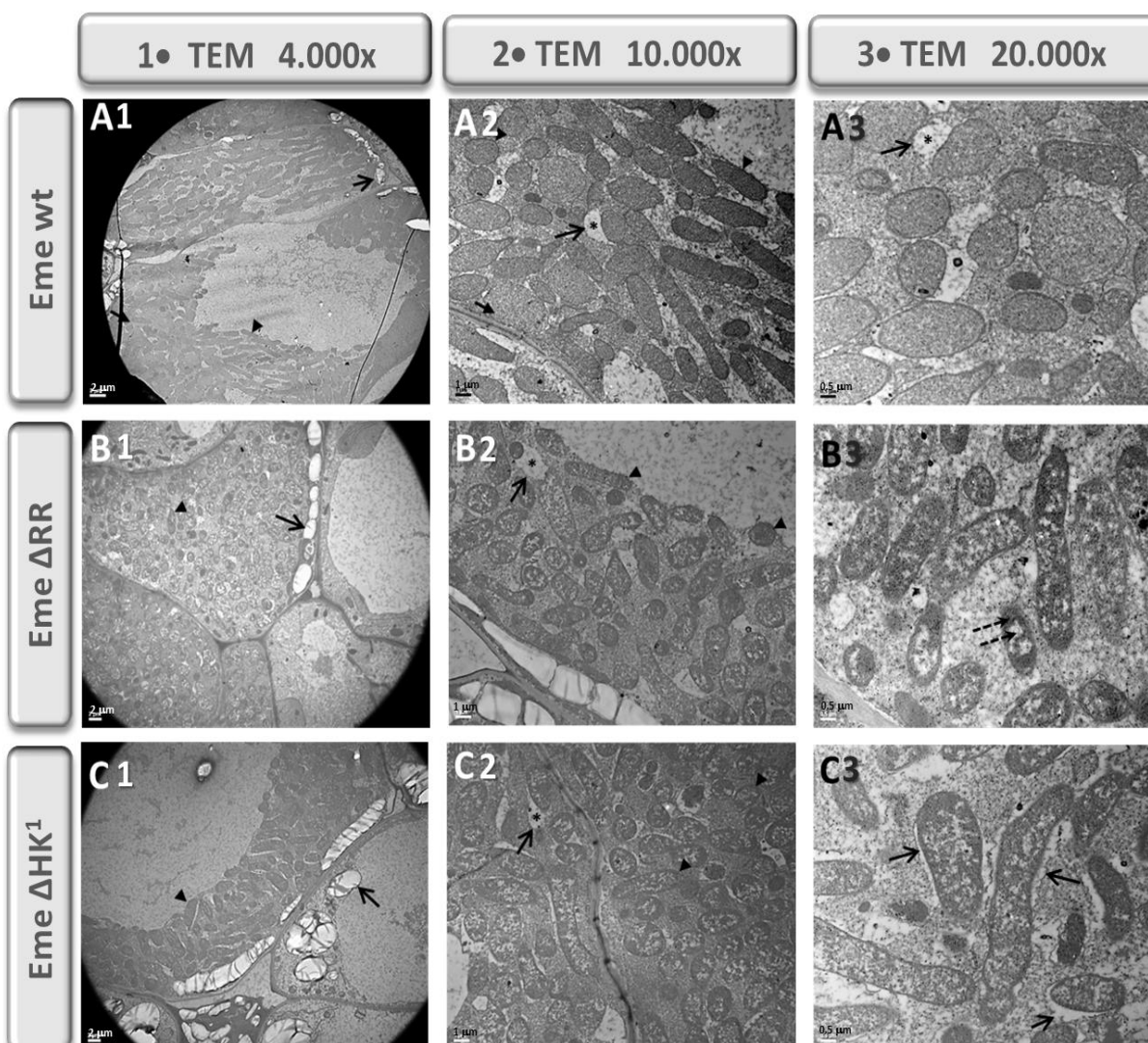


Figura 7. 5. Micrografías TEM de la zona III de nódulos inducidos por *E. meliloti* salvaje o mutantes. Las figuras corresponden a fotografías de cortes ultrafinos de nódulos de 35 dpi infectados con *E. meliloti* salvaje (Eme wt, paneles A) o Eme Δ RR (paneles B) y Eme Δ HK¹ (paneles C). Se distinguen bacteroides esféricos y alargados que sufrieron cortes transversales o longitudinales respectivamente (cabezas de flecha). **(1)** Las flechas indican depósitos de posibles gránulos de reserva en la periferia de las células vegetales. **(2)** Se distinguen el espacio peribacteroidal (PBS, *) generado por una membrana peribacteroidal (flecha) que engloba a un bacteroide. **(3)** Se indica la membrana peribacteroidal (flechas); el espacio peribacteroidal generado por ésta (PBS, *); y zonas de distinto contraste de la ultraestructura de los bacteroides (flechas discontinuas). Las micrografías representativas fueron seleccionadas de tres muestras biológicas independientes. Barras= 2 μ m (1), 1 μ m (2), 0,5 μ m (3).

La Figura 7.5 pone de manifiesto además diferencias marcadas en la ultraestructura de los bacteroides. En los bacteroides presentes en nódulos inducidos por Eme wt podemos ver cierta homogeneidad en el interior celular mientras que en los bacteroides presentes en nódulos inducidos por los mutantes se observan regiones de alto y bajo contraste

intercaladas (Figura 7.5, B3 y C3) que podrían corresponder a diferencias en el grado de condensación del material genético (Vasse *et al.* 1990).

Así mismo, este análisis permitió identificar un espacio por fuera de los bacteroides denominado espacio peribacteroidal (PBS, del inglés *peribacteroid space*) delimitado por la membrana peribacteroidal (PBM, del inglés *peribacteroid membrane*) (Brewin 2004). A pesar que la PBM que engloba los bacteroides es capaz de ser identificada por esta técnica (Vasse *et al.* 1990), en las micrografías presentadas en la Figura 7.5 no se llega a apreciar con claridad. Sin embargo, la existencia de PBSs en algunos simbiosomas facilita la identificación de los mismos (Figura 7.5, paneles 2 y 3).

En lo que respecta a las PBM y los PBS asociados, podemos ver que las células vegetales colonizadas por bacteroides mutantes (Figura 7.5, paneles B y C) se pueden distinguir mayor número de simbiosomas con PBM más irregulares que en las ocupadas por bacteroides de tipo salvaje. Esta característica, más marcada en las células ocupadas por Eme ΔHK^1 , resulta en PBSs más evidentes. Además, algunos bacteroides son englobados por una PBM con una morfología de tipo cresta (Figura 7.5, C3). Se ha reportado este fenómeno en bacteroides mutantes en genes de fijación de nitrógeno (Vasse *et al.* 1990) y en mutantes en transportadores de cobre (Patel *et al.* 2014). Además, en algunas regiones en las células del nódulo ocupadas por el mutante en la HK se pueden distinguir simbiosomas que poseen la PBM disgregada (Figura 7.5, C3). En plantas que desarrollan nódulos indeterminados, se ha visto esta característica en el comienzo del proceso de senescencia (Pladys y Rigaud 1985; Puppo *et al.* 1991).

La PBM es el actor principal en el intercambio bidireccional de nutrientes durante el período que está en contacto con el bacteroide (Bolaños *et al.* 2004; Limpens *et al.* 2009). Los cambios morfológicos observados en las PBM inducidos por los mutantes de ambos genes (SMc02366 y SMc02367), sugieren la presencia de una interacción poco eficiente entre la PBM y la membrana externa del bacteroide.

Desde el punto de vista del bacteroide, una inadecuada interacción con la PBM puede resultar en una menor utilización de la energía que le suministra la planta para llevar a cabo no solo la FBN, sino también procesos relacionados con la supervivencia dentro del simbiosoma. En la Figura 7.5 (C3) se pueden apreciar zonas de disgregación de la PBM y la consecuente exposición de los bacteroides al posible daño por los mecanismos innatos de

defensa de la célula huésped como sustancias reactivas de oxígeno y proteasas (Puppo *et al.* 2005). A continuación, intentaremos dilucidar si existe un posible daño de la integridad de la membrana de los bacteroides mutantes.

7.2.3.4. Estudios de viabilidad de bacteroides de *E. meliloti* 2011 salvaje y cepas mutantes mediante microscopía confocal

Con el objetivo de evaluar si los bacteroides mutantes avanzan a una muerte prematura debido a una interacción inadecuada con la PBM, nos propusimos evaluar la integridad de su membrana (Haag *et al.* 2011). Para ello, utilizamos un ensayo de tinción vivo / muerto que involucra el tratamiento de cortes transversales de nódulos con una mezcla de dos sondas fluorescentes (SYTO9 e ioduro de propidio (PI, *Propidium Iodide*)), y posterior observación al microscopio confocal. Las bacterias que poseen la membrana plasmática intacta son teñidas por SYTO9 y se aprecian de color verde, mientras que las bacterias que tienen su membrana plasmática alterada son tenidas por PI y se observan rojas. Incubar secciones de nódulos con estas sondas en simultáneo, permite distinguir al microscopio confocal células vivas y muertas en base a su coloración

La Figura 7.6 muestra imágenes representativas de un corte longitudinal de un nódulo de *M. sativa* inducido por Eme wt y coloreado con esta técnica. Se distinguen las distintas zonas tisulares características de este tipo de nódulo y el detalle de células vegetales infectadas con bacteroides. Es importante mencionar que debido a la afinidad que poseen ambas sondas por los ácidos nucleicos, las células vegetales también son teñidas. El daño al tejido que genera naturalmente el corte, permite la entrada de PI al núcleo de la célula vegetal. Por ese motivo, los núcleos celulares se ven rojos.

Para avanzar en el análisis centramos nuestra atención en la zona III y zona IV de las secciones teñidas de los nódulos. En la Figura 7.7 se puede observar que la zona III de los nódulos colonizados por Eme ΔHK^2 (panel C1) y Eme $\Delta RR\Delta HK^2$ (panel D1), presentan similares niveles de abundancia de simbiosomas que la cepa salvaje (panel A1). En particular, el mutante Eme ΔRR , experimenta una ocupación de la zona ligeramente menos abundante que la de la cepa salvaje (panel B1). Se detectó además que estos bacteroides mutantes poseen la membrana comprometida, indicando una posible muerte celular (panel B2).

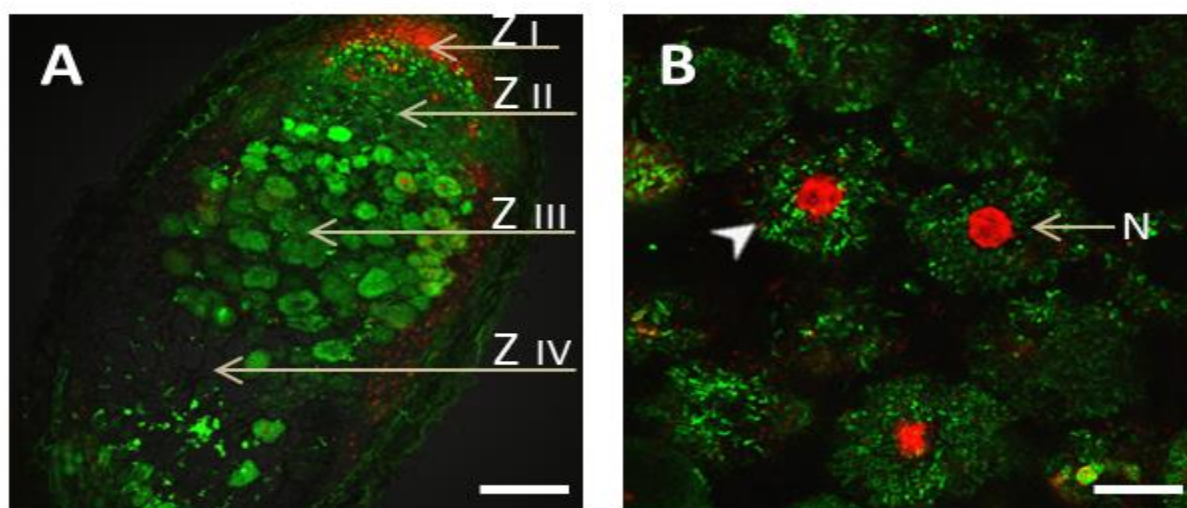


Figura 7. 6. Secciones longitudinales de nódulos maduros de *M. sativa* inducidos con *E. meliloti* salvaje fotografiados usando un microscopio confocal después del ensayo de tinción vivo/muerto.

A) Se indican las zonas histológicas típicas del nódulo indeterminado. Se observan células vegetales infectadas con bacteroides. **B)** Se muestra la ZIII marcada en el panel A. Se observan células vegetales infectadas con bacteroides. La flecha indica la presencia de bacteroides vivos/muertos (verde/rojo). N: núcleo de una célula vegetal. Las micrografías fueron seleccionadas de tres muestras biológicas independientes. Las barras de escala corresponden a 100 μm para A y 20 μm para B.

Además se observaron pequeños cambios en la abundancia de los bacteroides en nódulos ocupados por Eme ΔRR (Figura 7.7, B2), Eme ΔHK^2 (Figura 7.7, C2) y el doble mutante Eme $\Delta\text{RR}\Delta\text{HK}^2$ (Figura 7.7, D2) en comparación con Eme wt (Figura 7.7, A2). Estos resultados se correlacionan con los observados en la Figura 7.4, donde los nódulos infectados por los rizobios mutantes mostraron una menor densidad de bacteroides que los infectados con Eme wt. Este hecho sugiere que SMC02366 y SMC02367 son proteínas necesarias para que los rizobios se diferencien a bacteroides. Además, las diferencias más notorias evidenciadas con esta técnica resultaron de la exploración de la zona IV de los nódulos (Figura 7.7 Columna 3) que corresponde a una región de senescencia que comienza a diferenciarse a partir de los 30 dpi. Todas las cepas mutantes mostraron una menor colonización de esta zona en comparación con la cepa salvaje hecho que refleja una diferenciación incompleta a bacteroide o probablemente que el fracaso de la diferenciación induce la degradación de los bacteroides.

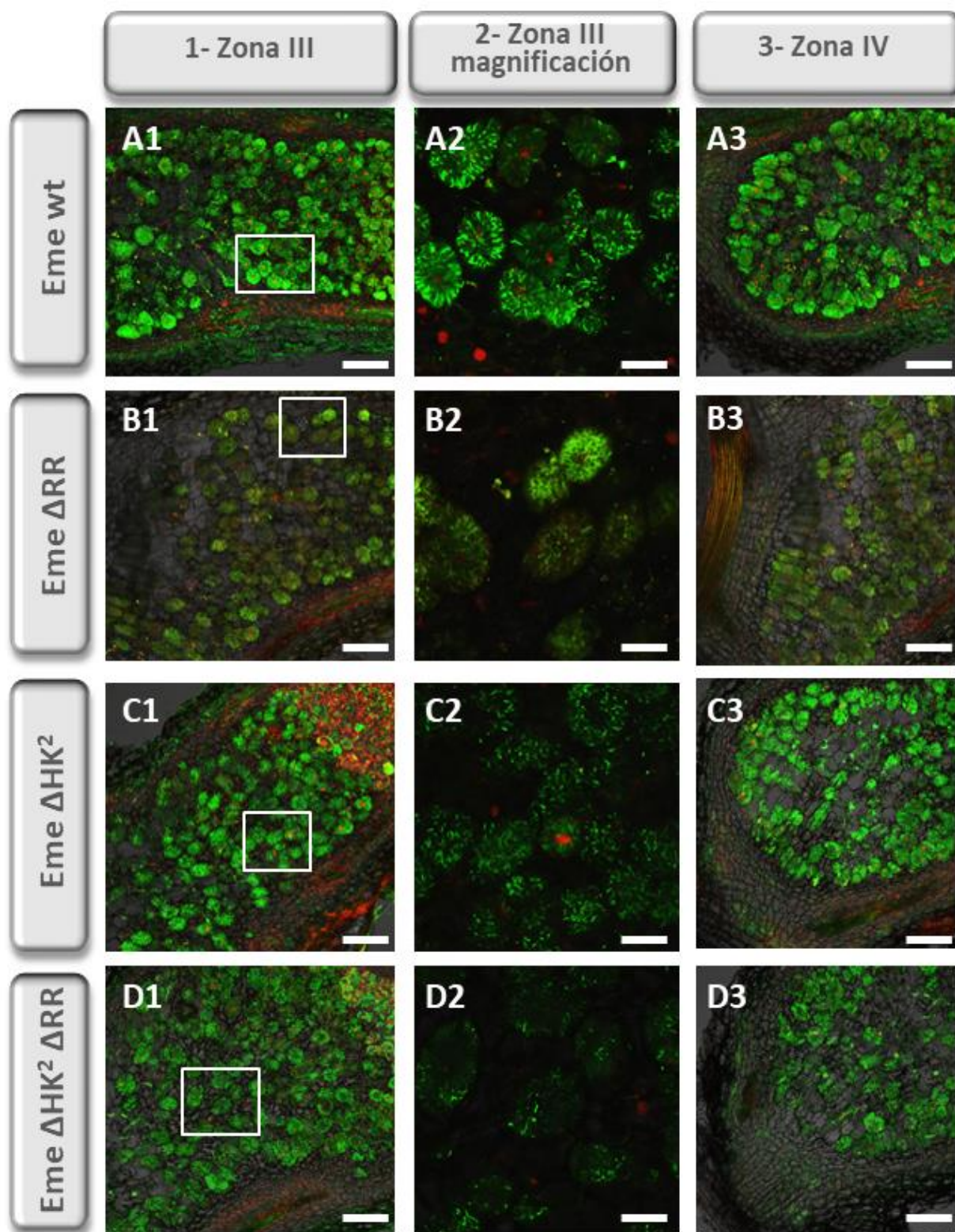


Figura 7. 7. Secciones longitudinales de nódulos maduros de *M. sativa* inducidos con *E. meliloti* 2011 wt y cepas mutantes fotografiados usando un microscopio confocal después del ensayo de tinción vivo / muerto. Se tomaron nódulos 35 dpi inducidos por (A) Eme wt, (B) Eme ΔRR , (C) Eme ΔHK^2 y (D) Eme $\Delta RR\Delta HK^2$. 1) Corte longitudinal de nódulos maduros de *M. sativa*. Se observan células vegetales infectadas con bacteroides. 2) Magnificación de la zona III, región recuadrada en los paneles 1. Se observan células vegetales infectadas con bacteroides vivos/muertos (verde/rojo). 3) Se muestra la zona IV. Fotografías tomadas en los canales de emisión/absorción de Syto9 y PI fusionados. Las micrografías representativas fueron seleccionadas de tres muestras biológicas independientes. Las barras de escala corresponden a 100 μm para 1 y 3 y 20 μm para 2.

7.3. Conclusiones

Para lograr altas tasas de fijación de N_2 , el rizobio y la leguminosa deben estar estrechamente comunicados para el intercambio de nutrientes y el desarrollo óptimo del nódulo (Terpolilli *et al.* 2012). Los cambios en la expresión génica y en el metabolismo de simbioses que ocurren durante el proceso simbiótico y el desarrollo de un nódulo indeterminado han sido, por décadas, objeto de estudio. Los intentos iniciales para avanzar en este tema se limitaron a monitorear la ubicación de uno o un pequeño conjunto de productos génicos en cada etapa y dentro del nódulo a través de la generación de mutantes y/o técnicas histológicas. Posteriormente, se han examinado a nivel proteómico y transcriptómico mutantes de rizobios y de *Medicago* que generan nódulos detenidos en etapas particulares de desarrollo. Más recientemente, avances en los métodos de extracción de proteínas, metabolitos y transcriptos, junto con los aumentos en la sensibilidad de los instrumentos, han permitido observar los cambios de expresión génica y metabólicos que ocurren dentro de un nódulo indeterminado de tipo salvaje. Así ha sido reportada la sobreexpresión de SMc02366 y SMc02367 de *E. meliloti* dentro del nódulo de *M. truncatula* (Roux *et al.* 2014) y la sobreexpresión de SMc02366 en vida libre en medio ácido.

El patrón de expresión que presentan SMc02366 y SMc02367, en conjunto con los hallazgos presentados en los capítulos anteriores nos impulsó a evaluar el posible rol de estos genes/proteínas en diversas etapas del proceso simbiótico. Si bien no encontramos diferencias significativas en etapas tempranas de la vida asociativa del rizobio (colonización, competición, número de nódulos y cinética de nodulación), **el análisis microscópico de secciones semifinas mostró menos células infectadas en la zona III presentes en los simbiosomas de los mutantes. Esto sugiere que SMc02366 y SMc02367 serían necesarias durante el proceso de diferenciación que sufren las bacterias a bacteroides. Curiosamente, el análisis con mayor magnificación (TEM) reveló que la zona III de los nódulos infectados por las cepas mutantes posee simbiosomas con espacios peribacteroidales más amplios, membranas del simbiosoma disgregadas, y menor densidad de bacteroides en comparación con los observados en los nódulos infectados por Eme wt.**

A partir de los datos colectados, la quinasa SMc02367 es particularmente necesaria para una eficiente FBN. Estos datos en conjunto sugieren que SMc02366 y SMc02367 podrían

controlar la síntesis de una molécula que participe en el diálogo simbiótico. La ausencia de esta señal podría provocar una respuesta de defensa de la planta o simplemente evitar el avance del programa simbiótico en una etapa muy avanzada. Se han descrito previamente en *E. meliloti* mutaciones que generan fenotipos $\text{Fix}^+ \text{Nod}^-$, entre ellas Nex18, que es requerida para la formación de nódulos y FBN eficiente en leguminosas (Oke y Long 1999). En particular, este péptido se encontró significativamente disminuido en los ensayos proteómicos previamente presentados (Capítulo 5, Sección 5.2.2).

Con estas observaciones en mente, uno puede imaginar un modelo en el que estas proteínas regulen (directa o indirectamente) la expresión o el estado de fosforilación de otras proteínas que causen la ausencia/presencia o un desbalance de moléculas que participan en el diálogo simbiótico. Será interesante a futuro identificar los circuitos regulatorios que controlan estos genes y determinar las funciones de sus productos de expresión, sus estados de fosforilación y si existe *crosstalk* con otros/s sistema/s de transducción de señales que explique la diferencia en peso seco de la parte aérea de las plantas obtenidas al ensayar los mutantes en el RR y la HK.

Al mismo tiempo y teniendo en cuenta el alto grado de conservación de genes homólogos en otros rizobios (Capítulo 4, Sección 4.2.7), podrá indagarse el rol de este TCS en otras simbiosis (nódulos determinados) donde el proceso dinámico de formación del nódulo es diferente al que ocurre entre *M. sativa* y *E. meliloti*.

Discusión general

Discusión general

Ante la problemática demográfica que el planeta tendrá que enfrentar en las próximas décadas, es necesario orientar esfuerzos hacia el aumento de la producción primaria de alimentos en un mundo cada vez más escaso de recursos. En este contexto, gran parte de la comunidad científica está enfocada en minimizar el uso de energías no renovables, estimular buenas prácticas agronómicas y potenciar las asociaciones beneficiosas que brinda la naturaleza.

El cultivo de alfalfa posee una gran demanda de varios nutrientes, especialmente N. El N puede ser tomado del suelo o incorporado por fijación de N₂ atmosférico en la asociación simbiótica con *E. meliloti*. Por lo tanto, cualquier factor que afecte la capacidad de fijar N₂ implica un mayor consumo del N del suelo. Entre estos factores se encuentra la acidez del suelo que afecta tanto la sobrevivencia de las bacterias como diversas etapas del proceso simbiótico. La tolerancia a la acidez de la bacteria (y de la planta) favorecerá sin duda la persistencia de los participantes en ambientes ácidos, y una mayor actividad metabólica de los mismos. Por esto, uno de nuestros principales objetivos fue contribuir al conocimiento de aspectos determinantes de la tolerancia a la acidez y con ello a la mejora de la asociación *E. meliloti* – alfalfa. Nuevas formulaciones de inoculantes direccionados a mejorar las dificultades específicas de las distintas regiones del planeta serán piezas clave hacia el aumento de la producción de cultivos. Para llevar a cabo esta estrategia, debemos conocer al detalle las actividades bioquímicas que subyacen en las complejas relaciones simbióticas.

Sobre la base de las consideraciones anteriores, en este trabajo de tesis en particular nos centramos en estudiar al sistema modelo *E. meliloti* – *M. sativa* para avanzar en la caracterización funcional de los TCS y en la comprensión de los mecanismos moleculares que posee este organismo para adaptarse a la exposición a condiciones ácidas. Para ello hemos utilizado técnicas microbiológicas, de biología molecular y ómicas de última generación. Hemos detectado que SMC02366 y SMC02367 están vinculados con la tolerancia a la acidez y constituyen un TCS altamente conservado en *E. meliloti* y en otras rizobacterias. A lo largo de la evolución los homólogos de este TCS predicho han conservado rasgos estructurales, secuenciales y un elevado grado de sintenia. Resultó especialmente interesante, y promueve nuevos interrogantes, la moderada variabilidad secuencial asociada a la región 3' del operón. El gen *glnE* presenta mucha menor conservación y su presencia está acotada a géneros

filogenéticamente emparentados. Los avances respecto a la caracterización funcional y de los determinantes moleculares a través de los que operan cada uno de los miembros del sistema nos permitirá confirmar la designación funcional de RR e HK que proponemos. Serán necesarios ensayos *in vitro* destinados a evaluar la actividad y especificidad que posee SMc02367 para fosforilar / desfosforilar a SMc02366, o a otros reguladores predichos. Como ya hemos mencionado, la funcionalidad de genes homólogos a SMc02366 y SMc02367 en otras rizobacterias aún resta ser explorada.

Con el propósito de dar luz a las funciones asociadas al rol de SMc02366 / SMc02367 en vida libre de *E. meliloti*, exploramos y caracterizamos los fenotipos asociados a la pérdida de su función y complementación funcional (Capítulo 4). Dicho análisis nos permitió hallar un vínculo entre la actividad de este TCS predicho y la capacidad del rizobio para sostener la sobrevivencia/multiplicación de las bacterias en condiciones de acidez, frente a altas concentraciones de cobre, hierro y aluminio y para mantener su respuesta ATR. Si bien comprobamos que los ORFs que codifican para el RR, la HK y GlnE se transcriben en un mismo ARNm en ambas condiciones de pH ensayadas (pH=7,0 o pH=5,6), el mutante Eme *glnE* cultivado en acidez se comportó como la cepa salvaje, con lo cual GlnE no participaría de la capacidad bacteriana para sobrevivir/multiplicarse en condiciones de acidez. Estos ensayos fueron realizados en cultivos *batch*, con el intento de emular situaciones de estrés que puede encontrar la bacteria en el suelo agrícola. Sin embargo, debemos tener presente que este enfoque se aleja de las situaciones que normalmente los rizobios encuentran en un suelo escaso de nutrientes y en un ambiente con temperatura no controlada.

La reciente descripción del hilo de infección y de los simbiosomas como ambientes naturalmente ácidos propone que, en la vida simbiótica, los cambios que experimenta *E. meliloti* para adaptarse a ese entorno podrían estar vinculados al sistema SMc02366 / SMc02367 de una manera similar a lo que ocurre en vida libre. En efecto, hemos descripto que SMc02366 / SMc02367 juega un rol relevante en la simbiosis *E. meliloti* – alfalfa. En particular, demostramos que estas proteínas (directa o indirectamente) participan en la progresión de bacteria a bacteroide y en la correcta asociación entre el bacteroide y la membrana del simbiosoma. Esta última observación, fue puesta en evidencia al detectar una senescencia prematura y el incremento de membranas peribacteroidales más laxas que dejan entrever espacios peribacteroidales en nódulos ocupados por los mutantes Eme Δ RR y

Eme Δ HK. Hemos evidenciado que SMC02367 interviene en etapas tardías de la asociación simbiótica y repercute en un menor desarrollo de la planta hospedadora cuando esta HK está ausente (Capítulo 7).

Con el propósito de hallar los factores moleculares asociados a la función de regulador SMC02366 y reconocer los mediadores de la respuesta celular del mismo, exploramos los cambios en el perfil proteómico (Capítulo 5) y metabolómico (Capítulo 6) de los rizobios asociados a la presencia o ausencia del regulador. Dichos análisis nos permitieron identificar y validar la presencia de un grupo de marcadores génicos cuya abundancia se encuentra vinculada a SMC02366. Las aproximaciones proteómicas que realizamos indicaron que este regulador interviene - directa o indirectamente - en varios aspectos de la biología de *E. meliloti* que contribuyen de manera global al desarrollo de la respuesta fisiológica a bajo pH. En particular la proteasa DegP, y los sistemas de expulsión de drogas (o metabolitos citosólicos) MscK, MacAB y EmrAB muy probablemente tengan un rol activo en dicha respuesta. Para confirmar esta hipótesis, será interesante evaluar los niveles diferenciales de transcritos en presencia y ausencia del regulador de respuesta mediante PCR cuantitativa o fusiones transcripcionales. Además, su significación podrá ser validada con herramientas y mutantes ya disponibles en el laboratorio.

En relación a otros blancos de regulación en *E. meliloti* resultó interesante el hallazgo de la regulación ejercida por SMC02366 sobre la abundancia de la proteína NtrB, que es parte del TCS NtrC/NtrB. Este TCS no es esencial para la FBN en *E. meliloti* pero recientemente se demostró que NtrC regula positivamente la expresión del asRNA mmgR. Se cree que el promotor del asRNA mmgR integraría señales del metabolismo de C y N a través de, al menos, los reguladores globales NtrC y AniA, para proporcionar un nivel óptimo del mmgR que permita ajustar post-transcripcionalmente la expresión génica según la disponibilidad variable de C y N.

Respecto a la regulación positiva que el RR ejerce sobre el gen *nex18*, puesta de manifiesto experimentalmente a nivel proteómico, serán relevantes futuras investigaciones para poder comprender el significado biológico de la regulación a la que está sujeta y dilucidar si esta proteína juega algún rol en la adhesión de la membrana del bacteroide a la membrana del simbiosoma.

Los estudios proteómicos además han generado nuevos interrogantes acerca del rol de las proteínas con función aún desconocida. Si bien no hemos avanzado en la caracterización de la relevancia biológica de esas 8 proteínas diferencialmente expresadas, estas serán blanco inmediato de próximas investigaciones. Actualmente, en nuestro laboratorio están en marcha estudios proteómicos similares a pH neutro para indagar el rol de SMc02366 en la fisiología bacteriana a pH óptimo.

Finalmente, en relación a otros blancos de regulación, los estudios metabolómicos (a pesar de las limitaciones intrínsecas de la técnica) permitieron observar que el regulador podría participar en la regulación de enzimas necesarias para la obtención de energía por vías catabólicas centrales. Aparentemente existe algún tipo de relación entre SMc02366 con el metabolismo del carbono y la síntesis de aminoácidos. Además, a partir de un aumento de la vía biosintética de lisina, nuestros resultados proponen que el fenotipo de adaptación a la acidez regulado por SMc02366 podría estar ligado al consumo de protones intracelulares, que normalmente tienden a aumentar ante la exposición bacteriana a situaciones de acidez. Resultará interesante medir el pH intracelular en células salvajes y mutantes del TCS con sondas ionotrópicas.

Los resultados que hemos presentado en este trabajo de tesis han abordado la caracterización de aspectos evolutivos, bioquímicos, genéticos y simbióticos de un TCS en *E. meliloti*, simbionte de alfalfa. En particular se halló un fenotipo pleiotrópico de tolerancia a la acidez y a ciertos metales asociado a la pérdida de función de SMc02366 y/o SMc02367. Los resultados han revelado que la expresión del gen SMc02367 está directamente asociada con la eficiencia de la FBN trasladada a la biomasa vegetal y que ambas proteínas podrían controlar la síntesis de una molécula que participe en el diálogo simbiótico. La ausencia de esta señal podría evitar el avance del programa simbiótico en una etapa muy avanzada. En una etapa siguiente esperamos explorar las consecuencias de la sobre-expresión de algunos de los marcadores identificados, hacia la evaluación de eventuales mejoras fenotípicas frente al desafío del entorno ácido. Además, será interesante identificar los circuitos regulatorios que controlan estos genes, determinar sus estados de fosforilación y si existe *crosstalk* con otros/s sistema/s de transducción de señales que explique la diferencia en peso seco de la parte aérea de las plantas obtenidas al ensayar en forma indirecta la FBN de los mutantes Eme Δ RR y Eme Δ HK.

A la luz de los resultados alcanzados se podrán ahondar el análisis de los factores que regulan la expresión del propio regulador, analizar interacciones directas entre el RR y sus potenciales genes blanco y extender el estudio funcional a otros rizobios, particularmente a aquellos que desarrollan nódulos determinados con una dinámica diferente del modelo simbiótico estudiado en este trabajo de tesis.

Bibliografía

Bibliografía

- Abbas, B.A., Vineetha, K.E., Prasad, C.K., Vij, N., Hassani, R., Randhawa, G.S., 2002.** Symbiotic characteristics of cysteine and methionine auxotrophs of *Sinorhizobium meliloti*. *Indian J. Exp. Biol.* 40, 1121–1130.
- Abdelrahman, M., Jogaiah, S., Burritt, D.J., Tran, L.-S.P., 2018.** Legume genetic resources and transcriptome dynamics under abiotic stress conditions. *Plant. Cell Environ.*
- Abriata, L.A., Albanesi, D., Dal Peraro, M., de Mendoza, D., 2017.** Signal Sensing and Transduction by Histidine Kinases as Unveiled through Studies on a Temperature Sensor. *Acc. Chem. Res.* 50, 1359–1366.
- Aguilar, P.S., Hernandez-Arriaga, A.M., Cybulski, L.E., Erazo, A.C., de Mendoza, D., 2001.** Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* 20, 1681–1691.
- Ainsworth, E.A., Yendrek, C.R., Sitch, S., Collins, W.J., Emberson, L.D., 2012.** The effects of tropospheric ozone on net primary productivity and implications for climate change. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63, 637–661.
- Akimoto, S., Tanaka, A., Nakamura, K., Shiro, Y., Nakamura, H., 2003.** O₂-specific regulation of the ferrous heme-based sensor kinase FixL from *Sinorhizobium meliloti* and its aberrant inactivation in the ferric form. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 136–142.
- Aldridge, P., Jenal, U., 1999.** Cell cycle-dependent degradation of a flagellar motor component requires a novel-type response regulator. *Mol. Microbiol.* 32, 379–391.
- Aldridge, P., Paul, R., Goymer, P., Rainey, P., Jenal, U., 2003.** Role of the GGDEF regulator PleD in polar development of *Caulobacter crescentus*. *Mol. Microbiol.* 47, 1695–1708.
- Alunni, B., Gourion, B., 2016.** Terminal bacteroid differentiation in the legume-rhizobium symbiosis: nodule-specific cysteine-rich peptides and beyond. *New Phytol.* 211, 411–417.
- Ames, P., Bergman, K., 1981.** Competitive advantage provided by bacterial motility in the formation of nodules by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 148, 728–908 p.
- Ansaldi, M., Theraulaz, L., Mejean, V., 2004.** TorI, a response regulator inhibitor of phage origin in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 9423–9428.
- Antoine, R., Huvent, I., Chemlal, K., Deray, I., Raze, D., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F., 2005.** The periplasmic binding protein of a tripartite tricarboxylate transporter is involved in signal transduction. *J. Mol. Biol.* 351, 799–809.
- Aranjuelo, I., Arrese-Igor, C., Molero, G., 2014.** Nodule performance within a changing environmental context. *J. Plant Physiol.* 171, 1076–1090.
- Aravind, L., Ponting, C.P., 1999.** The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 176, 111–116.

- Argüello, J.M., González-Guerrero, M., Raimunda, D., 2011.** Bacterial Transition Metal P(1B)-ATPases, Transport Mechanism and Roles in Virulence. *Biochemistry* 50, 9940–9949.
- Arguello, J.M., Raimunda, D., Padilla-Benavides, T., 2013.** Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3, 73.
- Arias, A., Cervenansky, C., Gardiol, A., Martinez-Drets, G., 1979.** Phosphoglucose isomerase mutant of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 137, 409–414.
- Azizan, K.A., Baharum, S.N., Ressim, H.W., Noor, N.M., 2012.** GC-MS Analysis and PLS-DA Validation of the Trimethyl Silyl-Derivatization Techniques. *Am. J. Appl. Sci.* 9, 1124–1136.
- Bahlawane, C., Baumgarth, B., Serrania, J., Rüberg, S., Becker, A., 2008.** Fine-Tuning of Galactoglucan Biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti* by Differential WggR (ExpG)-, PhoB-, and MucR-Dependent Regulation of Two Promoters. *J. Bacteriol.* 190, 3456–3466.
- Baikalov, I., Schroder, I., Kaczor-Grzeskowiak, M., Grzeskowiak, K., Gunsalus, R.P., Dickerson, R.E., 1996.** Structure of the *Escherichia coli* response regulator NarL. *Biochemistry* 35, 11053–11061.
- Baker, T.A., Sauer, R.T., 2012.** ClpXP, an ATP-powered unfolding and protein-degradation machine. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1823, 15–28.
- Barnett, M.J., Hung, D.Y., Reisenauer, A., Shapiro, L., Long, S.R., 2001a.** A homolog of the CtrA cell cycle regulator is present and essential in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 183, 3204–10.
- Barnett, M.J., Hung, D.Y., Reisenauer, A., Shapiro, L., Long, S.R., 2001b.** A homolog of the CtrA cell cycle regulator is present and essential in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 183, 3204–3210.
- Barra, L., Pica, N., Gouffi, K., Walker, G.C., Blanco, C., Trautwetter, A., 2003.** Glucose 6-phosphate dehydrogenase is required for sucrose and trehalose to be efficient osmoprotectants in *Sinorhizobium meliloti*. *FEMS Microbiol. Lett.* 229, 183–188.
- Barsch, A., Patschkowski, T., Niehaus, K., 2004.** Comprehensive metabolite profiling of *Sinorhizobium meliloti* using gas chromatography-mass spectrometry. *Funct. Integr. Genomics* 4, 219–230.
- Barton, L.L., Fekete, F.A., Vester, C.R., Gill, P.R., Neilands, J.B., 1992.** Physiological characteristics of *Rhizobium meliloti* 1021 Tn5 mutants with altered rhizobactin activities. *J. Plant Nutr.* 15, 2145–2156.
- Barton, L.L., Johnson, G. V, Schitoskey, K., Wertz, M., 1996.** Siderophore-mediated iron metabolism in growth and nitrogen fixation by alfalfa nodulated with *Rhizobium meliloti*. *J. Plant Nutr.* 19,
- Bastiat, B., Sauviac, L., Bruand, C., 2010.** Dual control of *Sinorhizobium meliloti* RpoE2 sigma factor activity by two PhyR-type two-component response regulators. *J. Bacteriol.* 192, 2255–2265.
- Bearson, B.L., Lee, I.S., Casey, T.A., 2009.** *Escherichia coli* O157: H7 glutamate- and arginine-dependent acid-resistance systems protect against oxidative stress during extreme acid challenge. *Microbiology* 155, 805–812.
- Becker, A., Kleickmann, A., Keller, M., Arnold, W., Pühler, A., 1993.** Identification and analysis of the

- Rhizobium meliloti* *exoAMONP* genes involved in exopolysaccharide biosynthesis and mapping of promoters located on the *exoHKLAMONP* fragment. Mol. Gen. Genet. MGG 241, 367–379.
- Becker, A., Ruberg, S., Kuster, H., Roxlau, A.A., Keller, M., Ivashina, T., Cheng, H.P., Walker, G.C., Puhler, A., 1997.** The 32-kilobase *exp* gene cluster of *Rhizobium meliloti* directing the biosynthesis of galactoglucan: genetic organization and properties of the encoded gene products. J. Bacteriol. 179, 1375–1384.
- Bellsolell, L., Prieto, J., Serrano, L., Coll, M., 1994.** Magnesium binding to the bacterial chemotaxis protein CheY results in large conformational changes involving its functional surface. J. Mol. Biol. 238, 489–495.
- Beringer, J.E., 1974.** R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. J. Gen. Microbiol. 84, 188–198.
- Bernardelli, C.E., Luna, M.F., Galar, M.L., Boiardi, J.L., 2001.** Periplasmic PQQ-dependent glucose oxidation in free-living and symbiotic rhizobia. Curr. Microbiol. 42, 310–315.
- Berrier, C., Coulombe, A., Szabo, I., Zoratti, M., Ghazi, A., 1992.** Gadolinium ion inhibits loss of metabolites induced by osmotic shock and large stretch-activated channels in bacteria. Eur. J. Biochem. 206, 559–565.
- Bertani, G., 1951.** Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 62, 293–300.
- Bhate, M.P., Molnar, K.S., Goulian, M., DeGrado, W.F., 2015.** Signal Transduction in Histidine Kinases: Insights from New Structures. Structure 23, 981–994.
- Bilwes, A.M., Alex, L.A., Crane, B.R., Simon, M.I., 1999.** Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. Cell 96, 131–141.
- Bolanos, L., Redondo-Nieto, M., Rivilla, R., Brewin, N.J., Bonilla, I., 2004.** Cell surface interactions of *Rhizobium* bacteroids and other bacterial strains with symbiosomal and peribacteroid membrane components from pea nodules. Mol. Plant. Microbe. Interact. 17, 216–223.
- Botos, I., Noinaj, N., Buchanan, S.K., 2017.** Insertion of proteins and lipopolysaccharide into the bacterial outer membrane. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 372.
- Bradford, M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254.
- Brewin, N.J., 2004.** Plant Cell Wall Remodelling in the *Rhizobium*–Legume Symbiosis. CRC. Crit. Rev. Plant Sci. 23, 293–316.
- Burris, R., 1994.** Biological nitrogen fixation. Past and future. Am. Univ. Cairo Press 1–11.
- Caetano-Anolles, G., Gresshoff, P.M., 1991.** Plant genetic control of nodulation. Annu. Rev. Microbiol. 45, 345–382.
- Campbell, G.R.O., Reuhs, B.L., Walker, G.C., 2002.** Chronic intracellular infection of alfalfa nodules by *Sinorhizobium meliloti* requires correct lipopolysaccharide core. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 3938–43.

- Capra, E.J., Laub, M.T.**, 2012. Evolution of two-component signal transduction systems. *Annu. Rev. Microbiol.* 66, 325–347.
- Carlyon, R.E., Ryther, J.L., VanYperen, R.D., Griffiths, J.S.**, 2010. FeuN, a novel modulator of two-component signaling identified in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* 77, 170–182.
- Cebolla, A., Vinardell, J.M., Kiss, E., Olah, B., Roudier, F., Kondorosi, A., Kondorosi, E.**, 1999. The mitotic inhibitor *ccs52* is required for endoreduplication and ploidy-dependent cell enlargement in plants. *EMBO J.* 18, 4476–4484.
- Ceizel Borella, G., Lagares, A.J., Valverde, C.**, 2018. Expression of the small regulatory RNA gene *mmgR* is regulated negatively by AniA and positively by NtrC in *Sinorhizobium meliloti* 2011. *Microbiology* 164, 88–98.
- Chan, C., Paul, R., Samoray, D., Amiot, N.C., Giese, B., Jenal, U., Schirmer, T.**, 2004. Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 17084–17089.
- Chang, C., Tesar, C., Gu, M., Babnigg, G., Joachimiak, A., Pokkuluri, P.R., Szurmant, H., Schiffer, M.**, 2010. Extracytoplasmic PAS-Like Domains Are Common in Signal Transduction Proteins. *J. Bacteriol.* 192, 1156–1159.
- Chen, E.J., Sabio, E.A., Long, S.R.**, 2008. The periplasmic regulator ExoR inhibits ExoS/ChvI two-component signaling in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* 69, 1290–1303.
- Cheng, H.P., Walker, G.C.**, 1998. Succinoglycan production by *Rhizobium meliloti* is regulated through the ExoS-ChvI two-component regulatory system. *J. Bacteriol.* 180, 20–26.
- Chetal, K., Janga, S.C.**, 2015. OperomeDB: A Database of Condition-Specific Transcription Units in Prokaryotic Genomes. *Biomed Res. Int.* 2015, 318217.
- Cheung, J., Bingman, C.A., Reingold, M., Hendrickson, W.A., Waldburger, C.D.**, 2008. Crystal structure of a functional dimer of the PhoQ sensor domain. *J. Biol. Chem.* 283, 13762–13770.
- Cheung, J., Hendrickson, W.A.**, 2010. Sensor Domains of Two-Component Regulatory Systems. *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 116–123.
- Cheung, J., Hendrickson, W.A.**, 2009. Structural analysis of ligand stimulation of the histidine kinase NarX. *Structure* 17, 190–201.
- Chi, A., Valenzuela, L., Beard, S., Mackey, A.J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Jerez, C.A.**, 2007. Periplasmic Proteins of the Extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*: A high throughput proteomics analysis. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 2239–2251.
- Cho, U.S., Bader, M.W., Amaya, M.F., Daley, M.E., Klevit, R.E., Miller, S.I., Xu, W.**, 2006. Metal bridges between the PhoQ sensor domain and the membrane regulate transmembrane signaling. *J. Mol. Biol.* 356, 1193–1206.
- Clarke, D.J.**, 2010. The Rcs phosphorelay: more than just a two-component pathway. *Future Microbiol.* 5, 1173–1184.

- Cock, P.J.A., Whitworth, D.E.,** 2007. Evolution of prokaryotic two-component system signaling pathways: gene fusions and fissions. *Mol. Biol. Evol.* <https://doi.org/10.1093/molbev/msm170>
- Colebatch, G., Desbrosses, G., Ott, T., Krusell, L., Montanari, O., Kloska, S., Kopka, J., Udvardi, M.K.,** 2004. Global changes in transcription orchestrate metabolic differentiation during symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus*. *Plant J.* 39, 487–512.
- Collier, J.,** 2016. Cell cycle control in Alphaproteobacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 30, 107–113.
- Considine, M.J., Siddique, K.H.M., Foyer, C.H.,** 2017. Nature's pulse power: legumes, food security and climate change. *J. Exp. Bot.* 68, 1815–1818. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx099>
- Cronk, Q., Ojeda, I., Pennington, R.T.,** 2006. Legume comparative genomics: progress in phylogenetics and phylogenomics. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 99–103.
- Crook, M.B., Draper, A.L., Guillory, R.J., Griffiths, J.S.,** 2013. The *Sinorhizobium meliloti* Essential Porin RopA1 Is a Target for Numerous Bacteriophages. *J. Bacteriol.* 195, 3663–3671.
- Cuiv, P.O., Keogh, D., Clarke, P., O'Connell, M.,** 2008. The *hmuUV* genes of *Sinorhizobium meliloti* 2011 encode the permease and ATPase components of an ABC transport system for the utilization of both haem and the hydroxamate siderophores, ferrichrome and ferrioxamine B. *Mol. Microbiol.* 70, 1261–1273.
- Curtis, P.D., Brun, Y. V.,** 2010. Getting in the loop: regulation of development in *Caulobacter crescentus*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 13–41.
- Cybulski, L.E., Albanesi, D., Mansilla, M.C., Altabe, S., Aguilar, P.S., de Mendoza, D.,** 2002. Mechanism of membrane fluidity optimization: isothermal control of the *Bacillus subtilis* acyl-lipid desaturase. *Mol. Microbiol.* 45, 1379–1388.
- Dalton, D.A., Kramer, S.,** 2006. Nitrogen-fixing bacteria in non-legumes BT - Plant-Associated Bacteria, in: Gnanamanickam, S.S. (Ed.), . Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 105–130.
- Dalton, T.L., Scott, J.R.,** 2004. CovS Inactivates CovR and Is Required for Growth under Conditions of General Stress in *Streptococcus pyogenes*. *J. Bacteriol.* 186, 3928–3937.
- Danese, P.N., Silhavy, T.J.,** 1998. CpxP, a stress-combative member of the Cpx regulon. *J. Bacteriol.* 180, 831–839.
- Danese, P.N., Snyder, W.B., Cosma, C.L., Davis, L.J., Silhavy, T.J.,** 1995. The Cpx two-component signal transduction pathway of *Escherichia coli* regulates transcription of the gene specifying the stress-inducible periplasmic protease, DegP. *Genes Dev.* 9, 387–398.
- David, M., Daveran, M.L., Batut, J., Dedieu, A., Domergue, O., Ghai, J., Hertig, C., Boistard, P., Kahn, D.,** 1988. Cascade regulation of nif gene expression in *Rhizobium meliloti*. *Cell* 54, 671–683.
- Davies, B.W., Walker, G.C.,** 2007. Disruption of *sitA* compromises *Sinorhizobium meliloti* for manganese uptake required for protection against oxidative stress. *J. Bacteriol.* 189, 2101–2109.
- de Rudder, K.E., Lopez-Lara, I.M., Geiger, O.,** 2000. Inactivation of the gene for phospholipid N-

- methyltransferase in *Sinorhizobium meliloti*: phosphatidylcholine is required for normal growth. *Mol. Microbiol.* 37, 763–772.
- Del Papa, M.F., Balagué, L.J., Sowinski, S.C., Wegener, C., Segundo, E., Martínez Abarca, F., Toro, N., Niehaus, K., Pühler, A., Aguilar, O.M., Martínez-Drets, G., Lagares, A., 1999.** Isolation and characterization of alfalfa-nodulating rhizobia present in acidic soils of Central Argentina and Uruguay. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1420–1427.
- Delgado, M.A., Mouslim, C., Groisman, E.A., 2006.** The PmrA/PmrB and RcsC/YojN/RcsB systems control expression of the *Salmonella* O-antigen chain length determinant. *Mol. Microbiol.* 60, 39–50.
- Desbrosses, G.G., Kopka, J., Udvardi, M.K., 2005.** Lotus japonicus Metabolic Profiling. Development of Gas Chromatography-Mass Spectrometry Resources for the Study of Plant-Microbe Interactions. *Plant Physiol.* 137, 1302–1318.
- Dintner, S., Staron, A., Berchtold, E., Petri, T., Mascher, T., Gebhard, S., 2011.** Coevolution of ABC transporters and two-component regulatory systems as resistance modules against antimicrobial peptides in Firmicutes Bacteria. *J. Bacteriol.* 193, 3851–3862.
- Dogra, G., Purschke, F.G., Wagner, V., Haslbeck, M., Kriehuber, T., Hughes, J.G., Van Tassell, M.L., Gilbert, C., Niemeyer, M., Ray, W.K., Helm, R.F., Scharf, B.E., 2012.** *Sinorhizobium meliloti* CheA Complexed with CheS Exhibits Enhanced Binding to CheY1, Resulting in Accelerated CheY1 Dephosphorylation. *J. Bacteriol.* 194, 1075–1087.
- Domínguez-Ferreras, A., Muñoz, S., Olivares, J., Soto, M.J., Sanjuán, J., 2009.** Role of Potassium Uptake Systems in *Sinorhizobium meliloti* Osmoadaptation and Symbiotic Performance. *J. Bacteriol.* 191, 2133–2143.
- Downie, J.A., 2010.** The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 150–170.
- Draghi, W.O., Del Papa, M.F., Barsch, A., Albicoro, F.J., Lozano, M.J., Pühler, A., Niehaus, K., Lagares, A., 2017.** A metabolomic approach to characterize the acid-tolerance response in *Sinorhizobium meliloti*. *Metabolomics* 13.
- Draghi, W.O., Del Papa, M.F., Hellweg, C., Watt, S.A., Watt, T.F., Barsch, A., Lozano, M.J., Lagares Jr., A., Salas, M.E., López, J.L., Albicoro, F.J., Nilsson, J.F., Torres Tejerizo, G.A., Luna, M.F., Pistorio, M., Boiardi, J.L., Pühler, A., Weidner, S., Niehaus, K., Lagares, A., 2016a.** A consolidated analysis of the physiologic and molecular responses induced under acid stress in the legume-symbiont model-soil bacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Sci. Rep.* 6, 29278.
- Draghi, W.O., Del Papa, M.F., Pistorio, M., Lozano, M., de Los Angeles Giusti, M., Torres Tejerizo, G.A., Jofre, E., Boiardi, J.L., Lagares, A., 2010.** Cultural conditions required for the induction of an adaptive acid-tolerance response (ATR) in *Sinorhizobium meliloti* and the question as to whether or not the ATR helps rhizobia improve their symbiosis with alfalfa at low pH. *FEMS Microbiol. Lett.* 302, 123–130.
- Duhring, U., Axmann, I.M., Hess, W.R., Wilde, A., 2006.** An internal antisense RNA regulates expression of the photosynthesis gene *isiA*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 7054–7058.

- Dunn, M.F.**, 2015. Key roles of microsymbiont amino acid metabolism in rhizobia-legume interactions. *Crit. Rev. Microbiol.* 41, 411–451.
- Dupont, L., Garcia, I., Poggi, M.-C., Alloing, G., Mandon, K., Le Rudulier, D.**, 2004. The *Sinorhizobium meliloti* ABC transporter Cho is highly specific for choline and expressed in bacteroids from *Medicago sativa* nodules. *J. Bacteriol.* 186, 5988–5996.
- Dutta, R., Qin, L., Inouye, M.**, 1999. Histidine kinases: diversity of domain organization. *Mol. Microbiol.* 34, 633–640.
- Eda, S., Mitsui, H., Minamisawa, K.**, 2011. Involvement of the *smeAB* multidrug efflux pump in resistance to plant antimicrobials and contribution to nodulation competitiveness in *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2855–2862.
- Elkins T, Hortsch M, Bieber AJ, Snow PM, G.C.**, 1990. *Drosophila* fasciclin I is a novel homophilic adhesion molecule that along with fasciclin III can mediate cell sorting. *J. Cell Biol.* 110, 1825–1832.
- Esseling, J.J., Lhuissier, F.G.P., Emons, A.M.C.**, 2003. Nod Factor-Induced Root Hair Curling: Continuous Polar Growth towards the Point of Nod Factor Application. *Plant Physiol.* 132, 1982–1988.
- Evans, C.G.T.**, 1970. The continuous cultivation of microorganisms. II. Construction of a chemostat. *methods Microbiol.* 2, 277–327.
- Fahraeus, G.**, 1957. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J. Gen. Microbiol.* 16, 374–381.
- Ferguson, G.P., Datta, A., Baumgartner, J., Roop, R.M. 2nd, Carlson, R.W., Walker, G.C.**, 2004. Similarity to peroxisomal-membrane protein family reveals that *Sinorhizobium* and *Brucella* BacA affect lipid-A fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 5012–5017.
- Ferla, M.P., Patrick, W.M.**, 2014. Bacterial methionine biosynthesis. *Microbiology* 160, 1571–1584.
- Fernie, A.R., Trethewey, R.N., Krotzky, A.J., Willmitzer, L.**, 2004. Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
- Fischer, H.M.**, 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol. Rev.* 58, 352–386.
- Foster, J.W., Hall, H.K.**, 1991. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 173, 5129–5135.
- Foster, J.W., Hall, H.K.**, 1990. Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 172, 771–778.
- Foussard, M., Garnerone, A.-M., Ni, F., Soupène, E., Boistard, P., Batut, J.**, 1997. Negative autoregulation of the *Rhizobium meliloti* *fixK* gene is indirect and requires a newly identified regulator, FixT. *Mol. Microbiol.* 25, 27–37.
- Fowler, D., Coyle, M., Skiba, U., Sutton, M.A., Cape, J.N., Reis, S., Sheppard, L.J., Jenkins, A., Grizzetti, B., Galloway, J.N., Vitousek, P., Leach, A., Bouwman, A.F., Butterbach-Bahl, K.,**

- Dentener, F., Stevenson, D., Amann, M., Voss, M.,** 2013. The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 368, 20130164.
- Foyer, C.H., Lam, H.-M., Nguyen, H.T., Siddique, K.H.M., Varshney, R.K., Colmer, T.D., Cowling, W., Bramley, H., Mori, T.A., Hodgson, J.M., Cooper, J.W., Miller, A.J., Kunert, K., Vorster, J., Cullis, C., Ozga, J.A., Wahlqvist, M.L., Liang, Y., Shou, H., Shi, K., Yu, J., Fodor, N., Kaiser, B.N., Wong, F.-L., Valliyodan, B., Considine, M.J.,** 2016. Neglecting legumes has compromised human health and sustainable food production. *Nat. plants* 2, 16112.
- Francez-Charlot, A., Kaczmarczyk, A., Fischer, H.-M., Vorholt, J.A.,** 2015. The general stress response in Alphaproteobacteria. *Trends Microbiol.* 23, 164–171.
- Gage, D.J.,** 2004. Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 280–300.
- Galibert, F., Finan, T.M., Long, S.R., Puhler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M.J., Becker, A., Boistard, P., Bothe, G., Boutry, M., Bowser, L., Buhrmester, J., Cadieu, E., Capela, D., Chain, P., Cowie, A., Davis, R.W., Dreano, S., Federspiel, N.A., Fisher, R.F., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Golding, B., Gouzy, J., Gurjal, M., Hernandez-Lucas, I., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R.W., Jones, T., Kahn, D., Kahn, M.L., Kalman, S., Keating, D.H., Kiss, E., Komp, C., Lelaure, V., Masuy, D., Palm, C., Peck, M.C., Pohl, T.M., Portetelle, D., Purnelle, B., Ramsperger, U., Surzycki, R., Thebault, P., Vandenbol, M., Vorholter, F.J., Weidner, S., Wells, D.H., Wong, K., Yeh, K.C., Batut, J.,** 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* 293, 668–672.
- Galitski, T., Saldanha, A.J., Styles, C.A., Lander, E.S., Fink, G.R.,** 1999. Ploidy Regulation of Gene Expression. *Science* (80-.). 285, 251 LP-254.
- Galloway, J. N., Aber, J. D., Erisman, J. W., Seitzinger, S. P., Howarth, R. W., Cowling, E. B., & Cosby, B. J.,** 2003. The Nitrogen Cascade. *Bioscience* 53, 341–356.
- Galperin, M.Y.,** 2006. Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *J. Bacteriol.* 188, 4169–4182.
- Galperin, M.Y.,** 2005. A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: Bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC Microbiol.* 5, 35.
- Galperin, M.Y., Nikolskaya, A.N., Koonin, E. V.,** 2001. Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol. Lett.* 203, 11–21.
- Gao, R., Mack, T.R., Stock, A.M.,** 2007. Bacterial response regulators: versatile regulatory strategies from common domains. *Trends Biochem. Sci.* 32, 225–234.
- Garcia, P.P., Bringhurst, R.M., Pinedo, C.A., Gage, D.J.,** 2010. Characterization of a two-component regulatory system that regulates succinate-mediated catabolite repression in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 192, 5725–5735.
- Garcia Vescovi, E., Soncini, F.C., Groisman, E.A.,** 1996. Mg²⁺ as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell* 84, 165–174.
- Garg, N., Geetanjali,** 2007. Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: process and signaling. A

- review. *Agron. Sustain. Dev.* 27, 59–68.
- Garnerone, A.M., Cabanes, D., Foussard, M., Boistard, P., Batut, J., 1999.** Inhibition of the FixL sensor kinase by the FixT protein in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Biol. Chem.* 274, 32500–32506.
- Geddes, B.A., Gonzalez, J.E., Oresnik, I.J., 2014.** Exopolysaccharide production in response to medium acidification is correlated with an increase in competition for nodule occupancy. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 27, 1307–1317.
- Geddes, B.A., Oresnik, I.J., 2014.** Physiology, genetics, and biochemistry of carbon metabolism in the alphaproteobacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Can. J. Microbiol.* 60, 491–507.
- Geddes, B.A., Oresnik, I.J., 2012.** Inability To Catabolize Galactose Leads to Increased Ability To Compete for Nodule Occupancy in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 194, 5044–5053.
- Georg, J., Hess, W.R., 2011.** cis-antisense RNA, another level of gene regulation in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75, 286–300.
- Gepts, P., Beavis, W.D., Brummer, E.C., Shoemaker, R.C., Stalker, H.T., Weeden, N.F., Young, N.D., 2005.** Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the Cross-Legume Advances Through Genomics Conference. *Plant Physiol.*
- Gilles-Gonzalez, M.A., Gonzalez, G., Perutz, M.F., Kiger, L., Marden, M.C., Poyart, C., 1994.** Heme-based sensors, exemplified by the kinase FixL, are a new class of heme protein with distinctive ligand binding and autoxidation. *Biochemistry* 33, 8067–8073.
- Glazebrook, J., Ichige, A., Walker, G.C., 1993.** A *Rhizobium meliloti* homolog of the *Escherichia coli* peptide-antibiotic transport protein SbmA is essential for bacteroid development. *Genes Dev.* 7, 1485–1497.
- Glenn, A.R., Dilworth, M.J., 1994.** The life of root nodule bacteria in the acidic underground. *FEMS Microbiol. Lett.* 123, 1–9.
- Glenn, A.R., Reeve, W.G., Tiwari, R.P., Dilworth, M.J., 1999.** Acid tolerance in root nodule bacteria. *Novartis Found. Symp.* 221, 112–130.
- Gong, W., Hao, B., Chan, M.K., 2000.** New mechanistic insights from structural studies of the oxygen-sensing domain of *Bradyrhizobium japonicum* FixL. *Biochemistry* 39, 3955–3962.
- Gopel, Y., Gorke, B., 2012.** Rewiring two-component signal transduction with small RNAs. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 132–139.
- Gosselin, I., Wattraint, O., Riboul, D., Barbotin, J.-N., Portais, J.-C., 2001.** A deeper investigation on carbohydrate cycling in *Sinorhizobium meliloti*. *FEBS Lett.* 499, 45–49.
- Graham, P.H., Vance, C.P., 2003.** Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* 131, 872–877.
- Greck, M., Platzer, J., Sourjik, V., Schmitt, R., 1995.** Analysis of a chemotaxis operon in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* 15, 989–1000.

- Griffitts, J.S., Carlyon, R.E., Erickson, J.H., Moulton, J.L., Barnett, M.J., Toman, C.J., Long, S.R., 2008.** A *Sinorhizobium meliloti* osmosensory two-component system required for cyclic glucan export and symbiosis. *Mol. Microbiol.* 69, 479–490.
- Gudipaty, S.A., Larsen, A.S., Rensing, C., Mcevoy, M.M., 2012.** Regulation of Cu(I)/Ag(I) efflux genes in *Escherichia coli* by the sensor kinase CusS. *FEMS Microbiol. Lett.* 330, 30–37.
- Guimaraes, W.G., Gondim, A.C.S., Costa, P.M. da S., Gilles-Gonzalez, M.-A., Lopes, L.G.F., Carepo, M.S.P., Sousa, E.H.S., 2017.** Insights into signal transduction by a hybrid FixL: Denaturation study of on and off states of a multi-domain oxygen sensor. *J. Inorg. Biochem.* 172, 129–137.
- Gunn, J.S., Lim, K.B., Krueger, J., Kim, K., Guo, L., Hackett, M., Miller, S.I., 1998.** PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Mol. Microbiol.* 27, 1171–1182.
- Gut, H., Pennacchietti, E., John, R.A., Bossa, F., Capitani, G., De Biase, D., Grütter, M.G., 2006.** *Escherichia coli* acid resistance: pH-sensing, activation by chloride and autoinhibition in GadB. *EMBO J.* 25, 2643–2651.
- Haag, A.F., Arnold, M.F.F., Myka, K.K., Kerscher, B., Dall'Angelo, S., Zanda, M., Mergaert, P., Ferguson, G.P., 2013.** Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium-legume* symbiosis. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 364–383.
- Haag, A.F., Balaban, M., Sani, M., Kerscher, B., Pierre, O., Farkas, A., Longhi, R., Boncompagni, E., Hérouart, D., Dall'Angelo, S., Kondorosi, E., Zanda, M., Mergaert, P., Ferguson, G.P., 2011.** Protection of *Sinorhizobium* against Host Cysteine-Rich Antimicrobial Peptides Is Critical for Symbiosis. *PLOS Biol.* 9, e1001169.
- Hagiwara, D., Yamashino, T., Mizuno, T., 2004.** Genome-wide comparison of the His-to-Asp phosphorelay signaling components of three symbiotic genera of *Rhizobia*. *DNA Res.* 11, 57–65.
- Häse, C.C., Fedorova, N.D., Galperin, M.Y., Dibrov, P.A., 2001.** Sodium Ion Cycle in Bacterial Pathogens: Evidence from Cross-Genome Comparisons. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 353–370.
- Haswell, E.S., Phillips, R., Rees, D.C., 2011.** Mechanosensitive channels: what can they do and how do they do it? *Structure* 19, 1356–1369.
- Haydel, S.E., Malhotra, V., Cornelison, G.L., Clark-Curtiss, J.E., 2012.** The *prrAB* two-component system is essential for *Mycobacterium tuberculosis* viability and is induced under nitrogen-limiting conditions. *J. Bacteriol.* 194, 354–361.
- Heermann, R., Altendorf, K., Jung, K., 2003a.** The N-terminal input domain of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli* stabilizes the interaction between the cognate response regulator KdpE and the corresponding DNA-binding site. *J. Biol. Chem.* 278, 51277–51284.
- Heermann, R., Fohrmann, A., Altendorf, K., Jung, K., 2003b.** The transmembrane domains of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli* are not essential for sensing K⁺ limitation. *Mol. Microbiol.* 47, 839–848.
- Helena Mäkelä, P., Sarvas, M., Calcagno, S., Lounatmaa, K., 1978.** Isolation and genetic characterization of polymyxin-resistant mutants of *Salmonella*. *FEMS Microbiol. Lett.* 3, 323–

326.

- Hellweg, C., Pühler, A., Weidner, S.,** 2009. The time course of the transcriptomic response of *Sinorhizobium meliloti* 1021 following a shift to acidic pH. *BMC Microbiol.* 9, 37.
- Herigstad, B., Hamilton, M., Heersink, J.,** 2001. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *J. Microbiol. Methods* 44, 121–129.
- Hoch, J.A.,** 2017. A Life in *Bacillus subtilis* Signal Transduction. *Annu. Rev. Microbiol.* 71, 1–19.
- Hoch, J.A.,** 2000. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.*
- Holzer, S.U., Schlumberger, M.C., Jackel, D., Hensel, M.,** 2009. Effect of the O-antigen length of lipopolysaccharide on the functions of Type III secretion systems in *Salmonella enterica*. *Infect. Immun.* 77, 5458–5470.
- Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K., Pease, L.R.,** 1989. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* 77, 61–68.
- Howieson, J.G., Ewing, M.A.,** 1986. Acid tolerance in the *Rhizobium meliloti*-Medicago symbiosis. *Aust. J. Agric. Res.* 37, 55–64.
- Huang, Z.J., Edery, I., Rosbash, M.,** 1993. PAS is a dimerization domain common to Drosophila period and several transcription factors. *Nature* 364, 259–262.
- Hunger, K., Beckering, C.L., Marahiel, M.A.,** 2004. Genetic evidence for the temperature-sensing ability of the membrane domain of the *Bacillus subtilis* histidine kinase DesK. *FEMS Microbiol. Lett.* 230, 41–46.
- Hyytiäinen, H., Sjöblom, S., Palomäki, T., Tuikkala, A., Palva, E.T.,** 2003. The PmrA-PmrB two-component system responding to acidic pH and iron controls virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. *Mol. Microbiol.* 50, 795–807.
- Jacobs, C., Ausmees, N., Cordwell, S.J., Shapiro, L., Laub, M.T.,** 2003. Functions of the CckA histidine kinase in *Caulobacter* cell cycle control. *Mol. Microbiol.* 47, 1279–1290.
- Jamet, A., Sigaud, S., Van de Syde, G., Puppo, A., Herouart, D.,** 2003. Expression of the bacterial catalase genes during *Sinorhizobium meliloti*-*Medicago sativa* symbiosis and their crucial role during the infection process. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 16, 217–225.
- Janausch, I.G., Zientz, E., Tran, Q.H., Kroger, A., Unden, G.,** 2002. C4-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1553, 39–56.
- Jelesko, J.G., Lara, J.C., Leigh, J.A.,** 1993. *Rhizobium meliloti* mutants with decreased DAHP synthase activity are sensitive to exogenous tryptophan and phenylalanine and form ineffective nodules. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 6, 135–143.
- Jiang, P., Peliska, J.A., Ninfa, A.J.,** 1998. Reconstitution of the signal-transduction bicyclic cascade responsible for the regulation of Ntr gene transcription in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 37, 12795–12801.

- Jiang, W., Hou, Y., Inouye, M.**, 1997. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *J. Biol. Chem.* 272, 196–202.
- Jones, C.H., Danese, P.N., Pinkner, J.S., Silhavy, T.J., Hultgren, S.J.**, 1997. The chaperone-assisted membrane release and folding pathway is sensed by two signal transduction systems. *EMBO J.* 16, 6394–6406.
- Jones, K.M., Kobayashi, H., Davies, B.W., Taga, M.E., Walker, G.C.**, 2007. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 619–33.
- Kanjee, U., Houry, W.A.**, 2013. Mechanisms of Acid Resistance in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* 67, 65–81.
- Khan, S.R., Gaines, J., Roop, R.M., Farrand, S.K.**, 2008. Broad-Host-Range Expression Vectors with Tightly Regulated Promoters and Their Use To Examine the Influence of TraR and TraM Expression on Ti Plasmid Quorum Sensing. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5053–5062.
- Kim, D., Forst, S.**, 2001. Genomic analysis of the histidine kinase family in bacteria and archaea. *Microbiology* 147, 1197–1212.
- Kleihues, L., Lenz, O., Bernhard, M., Buhrke, T., Friedrich, B.**, 2000. The H(2) Sensor of *Ralstonia eutropha* Is a Member of the Subclass of Regulatory [NiFe] Hydrogenases. *J. Bacteriol.* 182, 2716–2724.
- Kobayashi, H., De Nisco, N.J., Chien, P., Simmons, L.A., Walker, G.C.**, 2009. *Sinorhizobium meliloti* CpdR1 is critical for coordinating cell-cycle progression and the symbiotic chronic infection. *Mol. Microbiol.* 73, 586–600.
- Kobayashi, H., Suzuki, T., Unemoto, T.**, 1986. Streptococcal cytoplasmic pH is regulated by changes in amount and activity of a proton-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* 261, 627–630.
- Komaniecka, I., Zamłyńska, K., Zan, R., Staszczak, M., Seta, I., Choma, A.**, 2016. Rhizobium strains differ considerably in outer membrane permeability and polymyxin B resistance 63, 1–9.
- Koretke, K.K., Lupas, A.N., Warren, P. V, Rosenberg, M., Brown, J.R.**, 2000. Evolution of two-component signal transduction. *Mol. Biol. Evol.* 17, 1956–1970.
- Kox, L.F.F., Wösten, M.M.S.M., Groisman, E.A.**, 2000. A small protein that mediates the activation of a two-component system by another two-component system. *EMBO J.* 19, 1861–1872.
- Kramer, G., Weiss, V.**, 1999. Functional dissection of the transmitter module of the histidine kinase NtrB in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 604–609.
- Krogh, S., Jorgensen, S.T., Devine, K.M.**, 1998. Lysis genes of the *Bacillus subtilis* defective prophage PBSX. *J. Bacteriol.* 180, 2110–2117.
- Krulwich, T.A., Sachs, G., Padan, E.**, 2011. Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 330–343.
- Kunert, K.J., Vorster, B.J., Fenta, B.A., Kibido, T., Dionisio, G., Foyer, C.H.**, 2016. Drought Stress Responses in Soybean Roots and Nodules. *Front. Plant Sci.* 7, 1015.

- Lagares, A., Caetano-Anolles, G., Niehaus, K., Lorenzen, J., Ljunggren, H.D., Puhler, A., Favelukes, G.,** 1992. A *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide mutant altered in competitiveness for nodulation of alfalfa. *J. Bacteriol.* 174, 5941–5952.
- Lämmerhofer, M., Weckwerth, W.,** 2013. *Metabolomics in Practice: Successful Strategies to Generate and Analyze Metabolic Data.* Wiley-VCH Verlag GmbH Co. KGaA.
- Lazzaro, M., Feldman, M.F., Garcia Vescovi, E.,** 2017. A Transcriptional Regulatory Mechanism Finely Tunes the Firing of Type VI Secretion System in Response to Bacterial Enemies. *MBio* 8.
- Lee, H., Hsu, F.-F., Turk, J., Groisman, E.A.,** 2004. The PmrA-regulated *pmrC* gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid A and polymyxin resistance in *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* 186, 4124–4133.
- Lee, J., Tomchick, D.R., Brautigam, C.A., Machius, M., Kort, R., Hellingwerf, K.J., Gardner, K.H.,** 2008. Changes at the KinA PAS-A dimerization interface influence histidine kinase function. *Biochemistry* 47, 4051–4064.
- Léonard, S., Ferrooz, J., Haine, V., Danese, I., Fretin, D., Tibor, A., de Walque, S., De Bolle, X., Letesson, J.-J.,** 2007. FtcR Is a New Master Regulator of the Flagellar System of *Brucella melitensis* 16M with Homologs in Rhizobiaceae. *J. Bacteriol.* 189, 131–141.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J.C., Dénarié, J.,** 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344, 781.
- Levina, N., Töttemeyer, S., Stokes, N.R., Louis, P., Jones, M.A., Booth, I.R.,** 1999. Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity. *EMBO J.* 18, 1730–1737.
- Li, X.-Z., Nikaido, H.,** 2009. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: an Update. *Drugs* 69, 1555–1623.
- Limpens, E., Ivanov, S., van Esse, W., Voets, G., Fedorova, E., Bisseling, T.,** 2009. Medicago N2-fixing symbiosomes acquire the endocytic identity marker Rab7 but delay the acquisition of vacuolar identity. *Plant Cell* 21, 2811–2828.
- Lopez, M.F., Cabrera, J.J., Salas, A., Delgado, M.J., Lopez-Garcia, S.L.,** 2017. Dissecting the role of NtrC and RpoN in the expression of assimilatory nitrate and nitrite reductases in *Bradyrhizobium diazoefficiens*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 110, 531–542.
- Lund, P., Tramonti, A., De Biase, D.,** 2014. Coping with low pH: molecular strategies in neutrophilic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 1091–1125.
- Lupas, A., Stock, J.,** 1989. Phosphorylation of an N-terminal regulatory domain activates the CheB methylesterase in bacterial chemotaxis. *J. Biol. Chem.* 264, 17337–17342.
- M. C. Poggi, y D.L.R.,** 2003. The *Sinorhizobium meliloti* glycine betaine biosynthetic genes (*betCBA*) are induced by choline and highly expressed in bacteroids. *Mol. Plant-Microbe Interact* 16, 709–719.

- MacLean, A.M., Finan, T.M., Sadowsky, M.J.**, 2007. Genomes of the Symbiotic Nitrogen-Fixing Bacteria of Legumes. *Plant Physiol.* 144, 615–622.
- Mandimba, G.**, 1995. Contribution of nodulated legumes on the growth of *Zea mays* L. under various cropping systems. *Symbiosis* 19, 213–222.
- Mao, F., Dam, P., Chou, J., Oلمان, V., Xu, Y.**, 2009. DOOR: a database for prokaryotic operons. *Nucleic Acids Res.* 37, D459–D463.
- Marina, A., Waldburger, C.D., Hendrickson, W.A.**, 2005. Structure of the entire cytoplasmic portion of a sensor histidine-kinase protein. *EMBO J.* 24, 4247–4259.
- Martinez-de Drets, G., Arias, A., Rovira de Cutinella, M.**, 1974. Fast- and slow-growing rhizobia: differences in sucrose utilization and invertase activity. *Can. J. Microbiol.* 20, 605–609.
- Martinez-Hackert, E., Stock, A.M.**, 1997. Structural relationships in the OmpR family of winged-helix transcription factors. *J. Mol. Biol.* 269, 301–312.
- Mascher, T.**, 2014. Bacterial (intramembrane-sensing) histidine kinases: signal transfer rather than stimulus perception. *Trends Microbiol.* 22, 559–565.
- Mascher, T., Helmann, J.D., Unden, G.**, 2006. Stimulus Perception in Bacterial Signal-Transducing Histidine Kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 910–938.
- Mascher, T., Margulis, N.G., Wang, T., Ye, R.W., Helmann, J.D.**, 2003. Cell wall stress responses in *Bacillus subtilis*: the regulatory network of the bacitracin stimulon. *Mol. Microbiol.* 50, 1591–1604.
- Mascher, T., Zimmer, S.L., Smith, T.-A., Helmann, J.D.**, 2004. Antibiotic-inducible promoter regulated by the cell envelope stress-sensing two-component system LiaRS of *Bacillus subtilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 2888–2896.
- Mauchline, T.H., Fowler, J.E., East, A.K., Sartor, A.L., Zaheer, R., Hosie, A.H.F., Poole, P.S., Finan, T.M.**, 2006. Mapping the *Sinorhizobium meliloti* 1021 solute-binding protein-dependent transportome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 17933–17938.
- Mellor, R.B.**, 1989. Bacteroids in the Rhizobium-Legume Symbiosis Inhabit a Plant Internal Lytic Compartment: Implications for other Microbial Endosymbioses. *J. Exp. Bot.* 40, 831–839.
- Mergaert, P., Uchiumi, T., Alunni, B., Evanno, G., Cheron, A., Catrice, O., Mausset, A.-E., Barloy-Hubler, F., Galibert, F., Kondorosi, A., Kondorosi, E.**, 2006. Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 5230–5235.
- Milcamps, A., de Bruijn, F.J.**, 1999. Identification of a novel nutrient-deprivation-induced *Sinorhizobium meliloti* gene (*hmgA*) involved in the degradation of tyrosine. *Microbiology* 145 (Pt 4), 935–947.
- Miyatake, H., Mukai, M., Park, S.Y., Adachi, S., Tamura, K., Nakamura, H., Nakamura, K., Tsuchiya, T., Iizuka, T., Shiro, Y.**, 2000. Sensory mechanism of oxygen sensor FixL from *Rhizobium meliloti*: crystallographic, mutagenesis and resonance Raman spectroscopic studies. *J. Mol. Biol.* 301,

415–431.

- Mobley, H.L., Island, M.D., Hausinger, R.P.**, 1995. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.* 59, 451–480.
- Müller, S., Götz, M., Beier, D.**, 2009. Histidine Residue 94 Is Involved in pH Sensing by Histidine Kinase ArsS of *Helicobacter pylori*. *PLoS One* 4, e6930.
- Munson, G.P., Lam, D.L., Outten, F.W., O'Halloran, T. V.**, 2000. Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 182, 5864–5871.
- Mykytczuk, N.C.S., Trevors, J.T., Ferroni, G.D., Leduc, L.G.**, 2010. Cytoplasmic membrane fluidity and fatty acid composition of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in response to pH stress. *Extremophiles* 14, 427–441.
- Nair, G.R., Lai, X., Wise, A.A., Rhee, B.W., Jacobs, M., Binns, A.N.**, 2011. The integrity of the periplasmic domain of the VirA sensor kinase is critical for optimal coordination of the virulence signal response in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 193, 1436–1448.
- Nishijyo, T., Haas, D., Itoh, Y.**, 2001. The CbrA-CbrB two-component regulatory system controls the utilization of multiple carbon and nitrogen sources in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 40, 917–931.
- Nogales, J., Blanca-Ordóñez, H., Olivares, J., Sanjuán, J.**, 2013. Conjugal transfer of the *Sinorhizobium meliloti* 1021 symbiotic plasmid is governed through the concerted action of one- and two-component signal transduction regulators. *Environ. Microbiol.* 15, 811–821.
- Nogales, J., Munoz, S., Olivares, J., Sanjuan, J.**, 2009. Genetic characterization of oligopeptide uptake systems in *Sinorhizobium meliloti*. *FEMS Microbiol. Lett.* 293, 177–187.
- Noguchi, K., Riggins, D.P., Eldahan, K.C., Kitko, R.D., Slonczewski, J.L.**, 2010. Hydrogenase-3 Contributes to Anaerobic Acid Resistance of *Escherichia coli*. *PLoS One* 5, e10132.
- Nowak, E., Panjikar, S., Morth, J.P., Jordanova, R., Svergun, D.I., Tucker, P.A.**, 2006. Structural and functional aspects of the sensor histidine kinase PrrB from *Mycobacterium tuberculosis*. *Structure* 14, 275–285.
- O'Connell, K.P., Thomashow, M.F.**, 2000. Transcriptional organization and regulation of a polycistronic cold shock operon in *Sinorhizobium meliloti* RM1021 encoding homologs of the *Escherichia coli* major cold shock gene *cspA* and ribosomal protein gene *rpsU*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 392–400.
- O'Hara, G.W., Goss, T.J., Dilworth, M.J., Glenn, A.R.**, 1989. Maintenance of Intracellular pH and Acid Tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1870–1876.
- O'Hara, B.P., Norman, R.A., Wan, P.T.C., Roe, S.M., Barrett, T.E., Drew, R.E., Pearl, L.H.**, 1999. Crystal structure and induction mechanism of AmiC–AmiR: a ligand-regulated transcription antitermination complex. *EMBO J.* 18, 5175 LP-5186.
- Oberto, J.**, 2013. SyntTax: a web server linking synteny to prokaryotic taxonomy. *BMC Bioinformatics*

14, 4.

- Oka, Y., Matsushita, T., Mochizuki, N., Quail, P.H., Nagatani, A.,** 2008. Mutant Screen Distinguishes between Residues Necessary for Light-Signal Perception and Signal Transfer by Phytochrome B. *PLoS Genet.* 4, e1000158.
- Oke, V., Long, S.R.,** 1999. Bacterial genes induced within the nodule during the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Mol. Microbiol.* 32, 837–849.
- Oldroyd, G.E.D., Downie, J.A.,** 2004. Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 566–576.
- Oldroyd, G.E.D., Murray, J.D., Poole, P.S., Downie, J.A.,** 2011. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu. Rev. Genet.* 45, 119–144.
- Olivares, J., Bedmar, E.J., Sanjuán, J.,** 2013. Biological nitrogen fixation in the context of global change. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 26, 486–94.
- Orive, R.,** 1983. Simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Leguminosas de Grano. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, pp. 69–94.
- Otto, K., Silhavy, T.J.,** 2002. Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 2287–2292.
- Pandey, S.,** 2016. Food Security in India: Need for Improved Distribution System. *Sch. Int. J. Bus. Policy Gov.* ISSN 2394-3351; Vol 3, No 7.
- Parish, T., Stoker, N.G.,** 2000. *glnE* is an essential gene in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 182, 5715–5720.
- Patel, S.J., Padilla-Benavides, T., Collins, J.M., Arguello, J.M.,** 2014. Functional diversity of five homologous Cu⁺-ATPases present in *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology* 160, 1237–1251.
- Patriarca, E.J., Riccio, A., Taté, R., Colonna-Romano, S., Iaccarino, M., Defez, R.,** 1993. The *ntrBC* genes of *Rhizobium leguminosarum* are part of a complex operon subject to negative regulation. *Mol. Microbiol.* 9, 569–577.
- Patriarca, E.J., Taté, R., Iaccarino, M.,** 2002. Key Role of Bacterial NH₄(+)-Metabolism in *Rhizobium*-Plant Symbiosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 203–222.
- Paul, E.,** 1988. Towards the year 2000: directions for future nitrogen research. *Adv. nitrogen Cycl. Agric. Ecosyst.* 415–425.
- Peck, M.C., Fisher, R.F., Long, S.R.,** 2006. Diverse Flavonoids Stimulate NodD1 Binding to nod Gene Promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 188, 5417–5427.
- Pellicic, V., Reyrat, J.M., Gicquel, B.,** 1996. Expression of the *Bacillus subtilis sacB* gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria. *J. Bacteriol.* 178, 1197–1199.
- Peng, W.-T., Lee, Y.-W., Nester, E.W.,** 1998. The Phenolic Recognition Profiles of the *Agrobacterium tumefaciens* VirA Protein Are Broadened by a High Level of the Sugar Binding Protein ChvE. *J.*

Bacteriol. 180, 5632–5638.

Peoples, M.B., Herridge, D.F., Ladha, J.K., 1995. Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? *Plant Soil* 174, 3–28.

Perego, M., Brannigan, J.A., 2001. Pentapeptide regulation of aspartyl-phosphate phosphatases. *Peptides* 22, 1541–1547.

Pérez-Mendoza, D., Aragón, I.M., Prada-Ramírez, H.A., Romero-Jiménez, L., Ramos, C., Gallegos, M.T., Sanjuán, J., 2014. Responses to elevated c-di-GMP levels in mutualistic and pathogenic plant-interacting bacteria. *PLoS One* 9.

Perez, J.C., Groisman, E.A., 2007. Acid pH activation of the PmrA/PmrB two-component regulatory system of *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* 63, 283–293.

Perret, X., Staehelin, C., Broughton, W.J., 2000. Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 180–201.

Pflock, M., Finsterer, N., Joseph, B., Mollenkopf, H., Meyer, T.F., Beier, D., 2006. Characterization of the ArsRS regulon of *Helicobacter pylori*, involved in acid adaptation. *J. Bacteriol.* 188, 3449–3462.

Pierre, O., Engler, G., Hopkins, J., Brau, F., Boncompagni, E., Herouart, D., 2013. Peribacteroid space acidification: a marker of mature bacteroid functioning in *Medicago truncatula* nodules. *Plant. Cell Environ.* 36, 2059–2070.

Pietiainen, M., Gardemeister, M., Mecklin, M., Leskela, S., Sarvas, M., Kontinen, V.P., 2005. Cationic antimicrobial peptides elicit a complex stress response in *Bacillus subtilis* that involves ECF-type sigma factors and two-component signal transduction systems. *Microbiology* 151, 1577–1592.

Piggot, P.J., Hilbert, D.W., 2004. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 579–586.

Pini, F., Frage, B., Ferri, L., De Nisco, N.J., Mohapatra, S.S., Taddei, L., Fioravanti, A., Dewitte, F., Galardini, M., Brilli, M., Villeret, V., Bazzicalupo, M., Mengoni, A., Walker, G.C., Becker, A., Biondi, E.G., 2013. The DivJ, CbrA and PleC system controls DivK phosphorylation and symbiosis in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* 90, 54–71.

Pistorio, M., Balague, L.J., Del Papa, M.F., Pich-Otero, A., Lodeiro, A., Hozbor, D.F., Lagares, A., 2002. Construction of a *Sinorhizobium meliloti* strain carrying a stable and non-transmissible chromosomal single copy of the green fluorescent protein GFP-P64L/S65T. *FEMS Microbiol. Lett.* 214, 165–170.

Pladys, D., Rigaud, J., 1985. Senescence in French-bean nodules: Occurrence of different proteolytic activities. *Physiol. Plant.* 63, 43–48.

Pobigaylo, N., Szymczak, S., Nattkemper, T.W., Becker, A., 2008. Identification of Genes Relevant to Symbiosis and Competitiveness in *Sinorhizobium meliloti* Using Signature-Tagged. Mutants. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 21, 219–231.

Pobigaylo, N., Wetter, D., Szymczak, S., Schiller, U., Kurtz, S., Meyer, F., Nattkemper, T.W., Becker,

- A., 2006. Construction of a large signature-tagged mini-Tn5 transposon library and its application to mutagenesis of *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4329–4337.
- Pogliano, J., Lynch, A.S., Belin, D., Lin, E.C., Beckwith, J., 1997. Regulation of *Escherichia coli* cell envelope proteins involved in protein folding and degradation by the Cpx two-component system. *Genes Dev.* 11, 1169–1182.
- Prell, J., Bourdes, A., Kumar, S., Lodwig, E., Hosie, A., Kinghorn, S., White, J., Poole, P., 2010. Role of symbiotic auxotrophy in the *Rhizobium*-legume symbioses. *PLoS One* 5, e13933.
- Puppo, A., Groten, K., Bastian, F., Carzaniga, R., Soussi, M., Lucas, M.M., de Felipe, M.R., Harrison, J., Vanacker, H., Foyer, C.H., 2005. Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytol.* 165, 683–701.
- Puppo, A., Herrada, G., Rigaud, J., 1991. Lipid peroxidation in peribacteroid membranes from French-bean nodules. *Plant Physiol.* 96, 826–830.
- Putnoky, P., Kereszt, A., Nakamura, T., Endre, G., Grosskopf, E., Kiss, P., Kondorosi, A., 1998. The *pha* gene cluster of *Rhizobium meliloti* involved in pH adaptation and symbiosis encodes a novel type of K⁺ efflux system. *Mol. Microbiol.* 28, 1091–1101.
- Racca, R; Collino, D; Dardanelli, J; Basigalup, D; Gonzáles, N; Brenzoni, E; Hein, N.Y.M.B., 2001. Contribución de la fijación biológica de nitrógeno a la nutrición nitrogenada de alfalfa en la región pampeana. Ediciones INTA.
- Ramanan, N., Wang, Y., 2000. A high-affinity iron permease essential for *Candida albicans* virulence. *Science* 288, 1062–1064.
- Rappleye, 2004. Silica Clean-up of DNA. Aroian Lab Protoc. Univ. California, San Diego.
- Raymond, J., Siefert, J.L., Staples, C.R., Blankenship, R.E., 2004. The natural history of nitrogen fixation. *Mol. Biol. Evol.* 21, 541–554.
- Reddy, V.S., Shlykov, M.A., Castillo, R., Sun, E.I., Saier, M.H., 2012. The Major Facilitator Superfamily (MFS) Revisited. *FEBS J.* 279, 2022–2035.
- Reeve, W.G., Tiwari, R.P., Wong, C.M., Dilworth, M.J., Glenn, A.R., 1998. The transcriptional regulator gene *phrR* in *Sinorhizobium meliloti* WSM419 is regulated by low pH and other stresses. *Microbiology* 144
- Renier, A., De Faria, S.M., Jourand, P., Giraud, E., Dreyfus, B., Rapior, S., Prin, Y., 2011. Nodulation of *Crotalaria podocarpa* DC. by *Methylobacterium nodulans* displays very unusual features. *J. Exp. Bot.* 62, 3693–3697.
- Riccillo, P.M., Muglia, C.I., De Bruijn, F.J., Roe, A.J., Booth, I.R., Aguilar, O.M., 2000. Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance. *J. Bacteriol.* 182, 1748–1753.
- Richardson, A.E., Simpson, R.J., 1989. Acid-tolerance and symbiotic effectiveness of *Rhizobium trifolii* associated with a *Trifolium subterraneum* L.-based pasture growing in an acid soil. *Soil Biol. Biochem.* 21, 87–96.

- Rius, N., Lorén, J.G.**, 1998. Buffering Capacity and Membrane H(+) Conductance of Neutrophilic and Alkalophilic Gram-Positive Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1344–1349.
- Ronson, C.W., Astwood, P.M., Nixon, B.T., Ausubel, F.M.**, 1987. Deduced products of C4-dicarboxylate transport regulatory genes of *Rhizobium leguminosarum* are homologous to nitrogen regulatory gene products. *Nucleic Acids Res.* 15, 7921–7934.
- Rossbach, S., Kunze, K., Albert, S., Zehner, S., Gottfert, M.**, 2014. The *Sinorhizobium meliloti* EmrAB efflux system is regulated by flavonoids through a TetR-like regulator (EmrR). *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 27, 379–387.
- Rothenbucher, M.C., Facey, S.J., Kiefer, D., Kossmann, M., Kuhn, A.**, 2006. The cytoplasmic C-terminal domain of the *Escherichia coli* KdpD protein functions as a K⁺ sensor. *J. Bacteriol.* 188, 1950–1958.
- Roux, B., Rodde, N., Jardinaud, M.-F., Timmers, T., Sauviac, L., Cottret, L., Carrere, S., Sallet, E., Courcelle, E., Moreau, S., Debelle, F., Capela, D., de Carvalho-Niebel, F., Gouzy, J., Bruand, C., Gamas, P.**, 2014. An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing. *Plant J.* 77, 817–837.
- Sadowski, C.S., Wilson, D., Schallies, K.B., Walker, G., Gibson, K.E.**, 2013. The *Sinorhizobium meliloti* sensor histidine kinase CbrA contributes to free-living cell cycle regulation. *Microbiology* 159, 1552–1563.
- Salas, M.E., Lozano, M.J., López, J.L., Draghi, W.O., Serrania, J., Torres Tejerizo, G.A., Albicoro, F.J., Nilsson, J.F., Pistorio, M., Del Papa, M.F., Parisi, G., Becker, A., Lagares, A.**, 2017. Specificity traits consistent with legume-rhizobia coevolution displayed by *Ensifer meliloti* rhizosphere colonization. *Environ. Microbiol.* 19, 3423–3438
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.**, 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory press.
- Santos, R., Herouart, D., Sigaud, S., Touati, D., Puppo, A.**, 2001. Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 14, 86–89.
- Sauviac, L., Bruand, C.**, 2014. A putative bifunctional histidine kinase/phosphatase of the HWE family exerts positive and negative control on the *Sinorhizobium meliloti* general stress response. *J. Bacteriol.* 196, 2526–2535.
- Schafer, A., Tauch, A., Jager, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., Puhler, A.**, 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145, 69–73.
- Schallies, K.B., Sadowski, C., Meng, J., Chien, P., Gibson, K.E.**, 2015. *Sinorhizobium meliloti* CtrA stability is regulated in a CbrA-dependent manner and influenced by CpdR1. *J. Bacteriol.* 197, JB.02593-14.
- Schäper, S., Krol, E., Skotnicka, D., Kaever, V., Hilker, R., Søgaard-Andersen, L., Becker, A.**, 2016. Cyclic di-GMP regulates multiple cellular functions in the Symbiotic Alphaproteobacterium *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 198, 521–535.

- Scharf, B., Schmitt, R.**, 2002. Sensory transduction to the flagellar motor of *Sinorhizobium meliloti*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 4, 183–186.
- Schlüter, J.-P., Reinkensmeier, J., Barnett, M.J., Lang, C., Krol, E., Giegerich, R., Long, S.R., Becker, A.**, 2013. Global mapping of transcription start sites and promoter motifs in the symbiotic α -proteobacterium *Sinorhizobium meliloti* 1021. BMC Genomics 14, 156.
- Sheng, J., Marquis, R.E.**, 2007. Malolactic fermentation by *Streptococcus mutans*. FEMS Microbiol. Lett. 272, 196–201.
- Shu, C.J., Zhulin, I.B.**, 2002. ANTAR: an RNA-binding domain in transcription antitermination regulatory proteins. Trends Biochem. Sci. 27, 3–5.
- Simon, R., Priefer, U., Puhler, A.**, 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram Negative Bacteria. Nat Biotech 1, 784–791.
- Singh, M. K. & Dominy, B.N.**, 2010. Thermodynamic resolution: how do errors in modeled protein structures affect binding affinity predictions? Proteins 78, 1613–1617.
- Slonczewski, J.L., Fujisawa, M., Dopson, M., Krulwich, T.A.**, 2009. Cytoplasmic pH measurement and homeostasis in bacteria and archaea. Adv. Microb. Physiol. 55, 1–79, 317.
- Smil, V.**, 1999. Nitrogen in crop production: An account of global flows. Global Biogeochem. Cycles 13, 647–662.
- Smits, W.K., Bongiorno, C., Veening, J.-W., Hamoen, L.W., Kuipers, O.P., Perego, M.**, 2007. Temporal separation of distinct differentiation pathways by a dual specificity Rap-Phr system in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 65, 103–120.
- Sohlenkamp, C., de Rudder, K.E.E., Geiger, O.**, 2004. Phosphatidylethanolamine is not essential for growth of *Sinorhizobium meliloti* on complex culture media. J. Bacteriol. 186, 1667–1677.
- Sohlenkamp, C., Geiger, O.**, 2016. Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. FEMS Microbiol. Rev. 40, 133–159.
- Song, Y., Peisach, D., Pioszak, A.A., Xu, Z., Ninfa, A.J.**, 2004. Crystal structure of the C-terminal domain of the two-component system transmitter protein nitrogen regulator II (NRII; NtrB), regulator of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. Biochemistry 43, 6670–6678.
- Staehelin, C., Forsberg, L.S., D’Haeze, W., Gao, M.-Y., Carlson, R.W., Xie, Z.-P., Pellock, B.J., Jones, K.M., Walker, G.C., Streit, W.R., Broughton, W.J.**, 2006. Exo-oligosaccharides of *Rhizobium* sp. strain NGR234 are required for symbiosis with various legumes. J. Bacteriol. 188, 6168–6178.
- Stearman, R., Yuan, D.S., Yamaguchi-Iwai, Y., Klausner, R.D., Dancis, A.**, 1996. A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. Science 271, 1552–1557.
- Stewart, V.**, 2003. Biochemical Society Special Lecture. Nitrate- and nitrite-responsive sensors NarX and NarQ of proteobacteria. Biochem. Soc. Trans.
- Stock, A.M., Robinson, V.L., Goudreau, P.N.**, 2000. Two-component signal transduction. Annu. Rev. Biochem. 69, 183–215.

- Storz, G. & Hengge-Aronis, 2000.** Bacterial stress responses. Washington, D.C. ASM Press.
- Stowers, M.D., 1985.** Carbon metabolism in *Rhizobium* species. Annu. Rev. Microbiol. 39, 89–108.
- Sukdeo, N., Charles, T.C., 2003.** Application of crossover-PCR-mediated deletion-insertion mutagenesis to analysis of the *bdhA-xdhA2-xdhB2* mixed-function operon of *Sinorhizobium meliloti*. Arch. Microbiol. 179, 301–304.
- Tamayo, R., Prouty, A.M., Gunn, J.S., 2005.** Identification and functional analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium PmrA-regulated genes. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 43, 249–258.
- Tanaka, T., Saha, S.K., Tomomori, C., Ishima, R., Liu, D., Tong, K.I., Park, H., Dutta, R., Qin, L., Swindells, M.B., Yamazaki, T., Ono, A.M., Kainosho, M., Inouye, M., Ikura, M., 1998.** NMR structure of the histidine kinase domain of the *E. coli* osmosensor EnvZ. Nature 396, 88–92.
- Tang, G., Wang, S., Lu, D., Huang, L., Li, N., & Luo, L., 2017.** Two-component regulatory system ActS/ActR is required for *Sinorhizobium meliloti* adaptation to oxidative stress. Microbiological research, 198, 1-7.
- Tate, R., 1995.** Soil microbiology (symbiotic nitrogen fixation). John Wiley Sons, Inc., New York, N.Y 307–333.
- Tatusov, R.L., Fedorova, N.D., Jackson, J.D., Jacobs, A.R., Kiryutin, B., Koonin, E. V, Krylov, D.M., Mazumder, R., Mekhedov, S.L., Nikolskaya, A.N., Rao, B.S., Smirnov, S., Sverdlov, A. V, Vasudevan, S., Wolf, Y.I., Yin, J.J., Natale, D.A., 2003.** The COG database: an updated version includes eukaryotes. BMC Bioinformatics 4, 41.
- Tatusov, R.L., Koonin, E. V, Lipman, D.J., 1997.** A genomic perspective on protein families. Science 278, 631–637.
- Taylor, B.L., Zhulin, I.B., 1999.** PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63, 479–506.
- Terpolilli, J.J., Hood, G.A., Poole, P.S., 2012.** What determines the efficiency of N(2)-fixing *Rhizobium*-legume symbioses? Adv. Microb. Physiol. 60, 325–389.
- Timmers, A.C., Auriac, M.C., Truchet, G., 1999.** Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. Development 126, 3617–3628.
- Tirichine, L., Sandal, N., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Albrechtsen, A.S., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., Stougaard, J., 2007.** A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. Science 315, 104–107.
- Tischler, A.D., Camilli, A., 2004.** Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. Mol. Microbiol. 53, 857–869.
- Tiwari, R.P., Reeve, W.G., Dilworth, M.J., Glenn, A.R., 1996.** Acid tolerance in *Rhizobium meliloti* strain WSM419 involves a two-component sensor-regulator system. Microbiology 142. Pt 7, 1693–704.

- Tiwari, R.P., Reeve, W.G., Glenn, A.R.**, 1992. Mutations conferring acid sensitivity in the acid-tolerant strains *Rhizobium meliloti* WSM419 and *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* WSM710. FEMS Microbiol. Lett. 100, 107–112.
- Trinick, M.J.**, 1980. Growth of *Parasponia* in agar tube culture and symbiotic effectiveness of isolates from parasponia spp. New Phytol. 85, 37–45.
- Tung, W.L., Chow, K.C.**, 1995. A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. Trends Genet. 11, 128–129.
- Ulrich, L.E., Koonin, E. V, Zhulin, I.B.**, 2005. One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. Trends Microbiol. 13, 52–56.
- Vaara, M., Vaara, T., Jensen, M., Helander, I., Nurminen, M., Rietschel, E.T., Makela, P.H.**, 1981. Characterization of the lipopolysaccharide from the polymyxin-resistant *pmrA* mutants of *Salmonella typhimurium*. FEBS Lett. 129, 145–149.
- Vance, C.P.**, 2001. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant Nutrition in a World of Declining Renewable Resources. Plant Physiol. 127, 390–397.
- Vasse, J., de Billy, F., Camut, S., Truchet, G.**, 1990. Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. J. Bacteriol. 172, 4295–4306.
- Vinardell, J.M., Fedorova, E., Cebolla, A., Kevei, Z., Horvath, G., Kelemen, Z., Tarayre, S., Roudier, F., Mergaert, P., Kondorosi, A., Kondorosi, E.**, 2003. Endoreduplication mediated by the anaphase-promoting complex activator CCS52A is required for symbiotic cell differentiation in *Medicago truncatula* nodules. Plant Cell 15, 2093–2105.
- Vogt, S.L., Raivio, T.L.**, 2012. Just scratching the surface: an expanding view of the Cpx envelope stress response. FEMS Microbiol. Lett. 326, 2–11.
- von Braun, J.**, 2007. The World Food Situation: New driving forces and required actions. Intl Food Policy Res Inst.
- von Uexküll, H.R., Mutert, E.**, 1995. Global extent, development and economic impact of acid soils. Plant Soil. 171, 1–15.
- Wagner, S.**, 2011. Biological Nitrogen Fixation. Nat. Educ. Knowl. 3(10), 15.
- Wang, C., Kemp, J., Da Fonseca, I.O., Equi, R.C., Sheng, X., Charles, T.C., Sobral, B.W.S.**, 2010. *Sinorhizobium meliloti* 1021 loss-of-function deletion mutation in *chvI* and its phenotypic characteristics. Mol. Plant. Microbe. Interact. 23, 153–160.
- Wang, D., Xue, H., Wang, Y., Yin, R., Xie, F., Luo, L.**, 2013. The *Sinorhizobium meliloti ntrX* Gene Is involved in succinoglycan production, motility, and symbiotic nodulation on Alfalfa. Appl. Environ. Microbiol. 79, 7150–7159.
- Wang, E.T., Martínez-Romero, E.**, 2000. *Sesbania herbacea*–*Rhizobium huautlense* nodulation in flooded soils and comparative characterization of *S. herbacea*-nodulating rhizobia in different environments. Microb. Ecol. 40, 25–32.

- Wani, S.P., Rupela, O.P., Lee, K.K.**, 1995. Sustainable agriculture in the semi-arid tropics through biological nitrogen fixation in grain legumes. *Plant Soil* 174, 29–49.
- Webb, B.A., Compton, K.K., Del Campo, J.S.M., Taylor, D., Sobrado, P., Scharf, B.E.**, 2017. *Sinorhizobium meliloti* chemotaxis to multiple amino acids is mediated by the chemoreceptor McpU. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 30, 770–777.
- Weir, B.S.**, 2016. The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website. URL <https://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>
- Willis, L.B., Walker, G.C.**, 1999. A novel *Sinorhizobium meliloti* operon encodes an alpha-glucosidase and a periplasmic-binding-protein-dependent transport system for alpha-glucosides. *J. Bacteriol.* 181, 4176–4184.
- Wojciechowski, M.F., Lavin, M., Sanderson, M.J.**, 2004. A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid matK gene resolves many well-supported subclades within the family. *Am. J. Bot.* 91, 1846–1862.
- Wösten, M.M., Kox, L.F., Chamnongpol, S., Soncini, F.C., Groisman, E.**, 2000. A signal transduction system that responds to extracellular iron. *Cell* 103, 113–125.
- Xia, J., Wishart, D.S.**, 2011. Metabolomic data processing, analysis, and interpretation using MetaboAnalyst. *Curr. Protoc. Bioinforma.* Chapter 14, Unit 14.10.
- Zahran, H.H.**, 1999. *Rhizobium*-Legume symbiosis and Nitrogen Fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 968–989.
- Zhou, Z., Ribeiro, A.A., Lin, S., Cotter, R.J., Miller, S.I., Raetz, C.R.**, 2001. Lipid A modifications in polymyxin-resistant *Salmonella typhimurium*: PMRA-dependent 4-amino-4-deoxy-L-arabinose, and phosphoethanolamine incorporation. *J. Biol. Chem.* 276, 43111–43121.